



## 亜鉛経口投与による摂食促進効果に関する研究

著者	西内 美香
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18373号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00124257">http://hdl.handle.net/10097/00124257</a>

亜鉛経口投与による摂食促進効果  
に関する研究

東北大学大学院農学研究科  
生物産業創成科学専攻 食品機能健康科学講座  
栄養学分野

西内 美香

## 目次

緒論	1
第一章 周術期の血清亜鉛値と亜鉛入り栄養補助食品の有用性	
1. 1 目的	5
1. 2 方法	5
1. 3 結果	7
1. 4 考察	13
1. 5 結論	15
第二章 周術期の血清亜鉛値と亜鉛付加による他の 2 価陽イオンの吸収及び摂食量について	
2. 1 目的	16
2. 2 方法	16
2. 3 結果	19
2. 4 考察	27
2. 5 結論	28
第三章 亜鉛経口投与によるラットの摂食促進効果に関する脳視床下部メタボローム解析	
3. 1 目的	29
3. 2 材料と方法	29
3. 3 結果	35
3. 4 考察	46
3. 5 結論	53
総合考察	54
参考文献	55



## 緒論

日本は、総人口に対して 65 歳以上の高齢者人口の占める割合が 1970 年 (昭和 45 年) の国勢調査で 7.1% となり「高齢化社会」、1995 年 (平成 7 年) の国勢調査では 14.5% となり「高齢社会」となった。さらに、2007 年 (平成 19 年) 人口推計の結果では、21.5% となり「超高齢社会」となり、高齢化が進んでいる。そのため病院へ入院する患者の高齢化も進んでいる。従って、以前は侵襲の大きな手術の対象となる患者の年齢の上限は 79 歳くらいであったが、近年は 80 歳代でも ADL (Activities of daily living: 日常生活動作) が自立しているならば、心筋梗塞に対する開胸術や胃癌に対する開腹術を施行する時代となっている。また、高齢者の増加に伴い、誤嚥性肺炎も増加している。肺炎は日本人の死因の第 3 位であるがその 9 割以上が 65 歳以上の高齢者であり、高齢者の肺炎のおよそ 7 割以上が誤嚥性肺炎と報告されている<sup>1)</sup>。

高齢者の場合、大きな侵襲の手術後や誤嚥性肺炎の治療後に食欲が回復しない場合は、やむを得ず静脈栄養法で栄養管理を行う。静脈栄養法は、経腸栄養法と比較すると感染のリスクが大きいと、なるべく早く経腸栄養法へ切り替えることが望まれる。管理栄養士はこのような場面に関わる仕事である。訪室することにより個々の患者の嗜好を知り、栄養補助食品を付加したり、形態を変化させる対応を行うと、患者は少しずつ食べられるようになることが多いが、どうしても食べてもらえない場合は、口からの栄養摂取を諦めて経管栄養 (経鼻栄養) もしくは胃瘻から栄養剤 (濃厚流動食) 投与法へ切り替えを行い、状態安定を保つケースも少なくない。

このような背景の下、近年「亜鉛」を投与すると食欲が回復するという報告<sup>2)</sup>があった。栄養補助食品には、亜鉛が入っている商品と入っていない商品があるが、元の職場では両タイプを患者の好みに合わせて提供していた。そこで誤嚥性肺炎で入院してきた患者で治療後に食欲が落ちてしまった患者に対し、血清亜鉛値を測定してみたところ、正常値下限ギリギリであった。そこで、これまで使用してきた亜鉛入り栄養補助食品を付加した所、翌日には食欲が出てきて 5 日後には経口より十分な栄養がとれるようになった。その後血清亜鉛値を測定してみたところ、正常値までに上昇していたことが分かった。また、亜鉛と食欲について調べたところ、当研究室においてもラットで経口からの亜鉛の投与が摂食量の増加をもたらすという報告<sup>3)</sup>を行っていた (Supplemental fig. 1-2)。

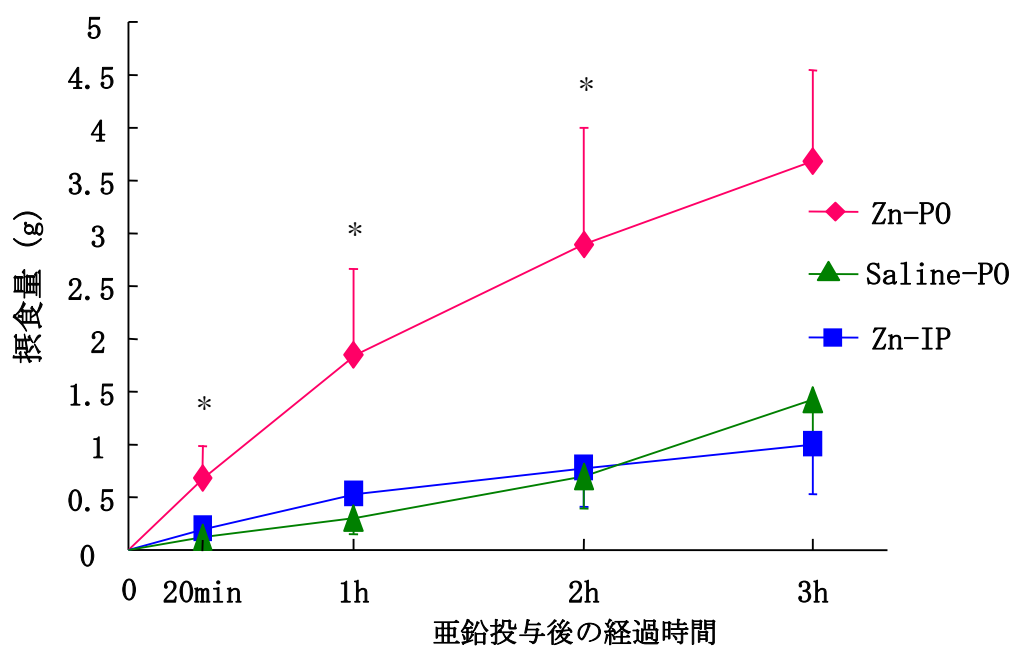
亜鉛は、標準体重のヒトで体内に約 2～3g 存在する。これは、鉄にほぼ匹敵する値である。からだ全体に存在するが、主に骨格筋、骨、皮膚、肝臓、脳、腎臓などに分布し、ほとんどがタンパク質などの高分子と結合している。亜鉛含有タンパク質は、いまや 3000 種類以上も同定されており、亜鉛の重要性がさらに高く評価されている。また、亜鉛には触媒機能があり、活性中心として酵素 300 種類以上に含まれるため、亜鉛不足の状態は、各種疾病の発症に深く関与している。

亜鉛の腸管からの吸収率は約 30%程度と言われ、吸収の過程で他の 2 価陽イオンである鉄や銅、カルシウムなどと拮抗することが報告されている。亜鉛の排泄は主に糞便を介して行われる。従って、代謝されて排泄された分は毎日補充されなければならない。しかし平成 25 年国民健康・栄養調査によると、亜鉛の平均摂取量は、成人男性 8.9 mg（中央値 8.6 mg）、成人女性 7.2 mg（中央値 6.9 mg）であり、半数以上の人々が摂取推奨量（男性 10 mg/日、女性 8 mg/日）を満たしていない。

その要因としては、昨今調理済みの出来合いの食物を食べる習慣が常習化し、食品添加物の摂取量が増加し、亜鉛キレート剤を多く摂取しているのではないかと危惧されている。その影響から、若者や働き盛りの中高年においても亜鉛が低下している可能性が考えられる。一方高齢者においても、食事量の低下や栄養素吸収率の低下も加わり、血清亜鉛値は年齢と逆相関すると言われている<sup>4)</sup>。従って、近年では老若男女を問わず血清亜鉛値が低値の可能性があり、食欲不振や味覚異常を訴える人が増えている。

このようなことから、循環器医療の現場で経験していたことがある。それは、侵襲の大きな開心術後の患者に対し、亜鉛を付加しないまま経過観察するよりも、早めに亜鉛を経口から付加した時の方が食欲の回復が早まっているのではないかということである。食欲の回復は、術後の心臓リハビリテーション

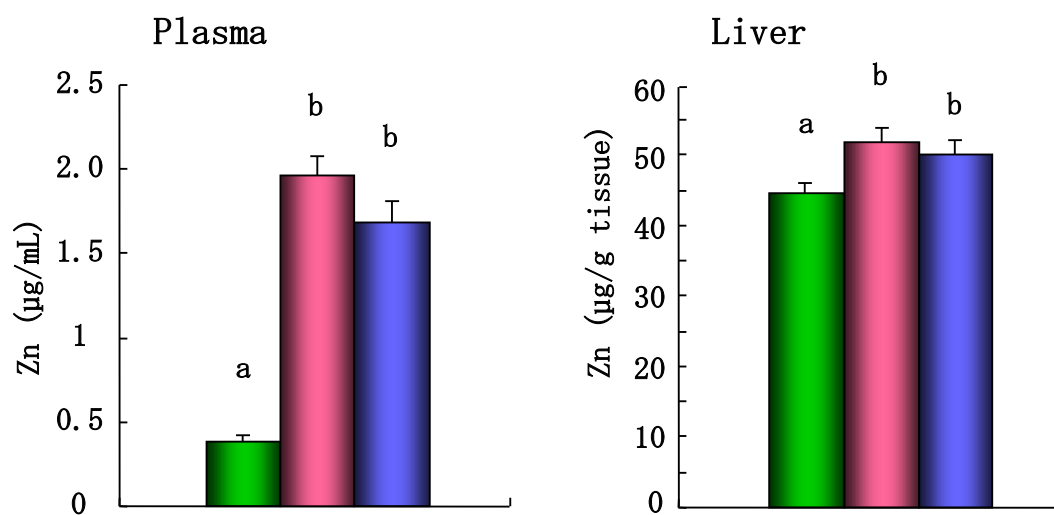
([http://www.ncvc.go.jp/hospital/section/support/cardio\\_rehabilitation/detail.html](http://www.ncvc.go.jp/hospital/section/support/cardio_rehabilitation/detail.html)) にも影響をもたらす。食欲が回復してくると心臓リハビリへ積極的に取り組む傾向がみられ、順調に進めば退院が予定通りとなり、退院延期は減り患者及び病院側にとっても好ましいことにつながる。従って本研究では、侵襲の大きな手術後の患者の食欲不振に対する亜鉛経口投与による食欲促進効果について解析すると共に、ラットを用いて摂食促進作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。



Supplemental fig. 1 亜鉛投与後のラット摂食量の変化

Means±SE. n=7 \*  $p < 0.05$  (vs Saline)

引用元：文献32より引用



Supplemental fig. 2

硫酸亜鉛投与3時間後のラット血漿と肝臓中の亜鉛濃度

Means  $\pm$  SE, n=7  $p < 0.05$ , different letter

■ Saline-P0

■ Zn-P0

■ Zn-IP

引用元：文献32より引用



## 第一章 周術期の血清亜鉛値と亜鉛入り栄養補助食品の有用性

### 1. 1 目的

超高齢社会となった日本において、高齢者に対する手術症例が増加している。仙台循環器病センターにおいても高齢者に対する冠動脈バイパス移植術や弁形成、弁置換といった侵襲の大きな開心術を施行する頻度が多くなっている。同時に周術期における食欲不振症状を呈する症例の増加を危惧してきた。侵襲の大きな手術後には、血清亜鉛値の低下が報告されている<sup>5-8)</sup>。亜鉛欠乏症は、味覚障害、舌痛症、褥瘡を含めた皮膚疾患、慢性的な下痢症、免疫機能低下といった症状を呈することが知られている。加えて食欲不振の原因の一つに血清亜鉛値の低下が挙げられている<sup>9)</sup>。今回、開心術周術期における血清亜鉛値の推移を調査した。また食欲低下に陥っている症例に対し経口的に亜鉛を付加し、食欲不振の改善の検討を行った。さらに術後血清亜鉛値の維持と平均在院日数に及ぼす効果を検討した。

### 1. 2 方法

#### 1. 2. 1 対象者

対象者は、仙台循環器病センターに入院し2013年6月から2014年6月までの期間に冠動脈バイパス移植術および弁形成、弁置換術を施行した38症例である(Table 1-1)。本研究は、仙台循環器病センター倫理委員会の承認を得た後、対象患者およびその家族に研究目的・方法および倫理的配慮事項を文書かつ口頭にて説明し同意を得て実施した。手術前の摂取量は8割から全量摂取されており特に問題は無く、術後2日前後で経口摂取を開始している患者とした。

Table 1-1 周術期の亜鉛付加研究（その 1）の対象患者 n=38

	食欲不振者 (亜鉛付加有)	非食欲不振者 (亜鉛付加無)	<i>p</i>
患者数 (名)	13	25	
男/女(名)	8 / 5	19 / 6	n. s.
年齢 (歳)	67 ± 9	67 ± 9	n. s.
術前血清亜鉛値 ( $\mu$ g / dL)	79 ± 11	75 ± 15	n. s.

平均値±標準偏差

#### 1. 2. 2 採血と測定方法

術前、術後 1 日目および退院時に血清亜鉛値を測定した。血液採取にあたり、採血シリッジと真空採血管のゴム栓からの亜鉛溶出を防ぐためディスポーザブルシリッジとプラスチック管を使用した。また血清亜鉛値の日内変動の観点から血液採取を午前に施行した。検体は（株）ビー・エム・エルへ委託し、原子吸光分光光度法にて血清亜鉛値を測定した（基準値：80～120  $\mu$  g/dL）。

#### 1. 2. 3 食欲不振の基準と改善の基準

食欲不振の基準は、3 日以上摂取量が半量以下の場合とした。具体的には、牛乳のみや果物のみ、又は数口程度から半量の摂取量である。食欲改善の目安は、8 割以上の摂取量とした。

#### 1. 2. 4 亜鉛給与量

病院食における亜鉛含有量は 1 日当たり 11～12 mg である。今回術後食欲不振群に対し、朝食時にサポートゼリー（ハウス食品 1 ケ 86 kcal, たんぱく質 5.0 g, 亜鉛 6.0 mg）、昼食時にコラーゲンゼリー（クリニコ 1 ケ 80 kcal, たんぱく質 6.0 g, 亜鉛 12.0

mg)、夕食時にエンジョイ小豆ゼリー (クリニコ 1ヶ 80 kcal, たんぱく質 3.5 g, 亜鉛 5.0 mg) を経口的に付加し、1日当たりの亜鉛総量は 34~35 mg とした。栄養補助食品の成分は様々であるが、今回は食欲改善に影響があるとされている亜鉛含有量の多い栄養補助食品 (以下、亜鉛入りゼリーと略) を用いた。

#### 1. 2. 5 群分けと比較内容

術後の食欲不振者に対してはすべて亜鉛入り栄養補助食品 (亜鉛入りゼリー (Zn:23 mg/day) を付加し、「食欲不振者」とし、術後の食欲不振を認めなかった症例には亜鉛付加をせず「非食欲不振者」とした (Table 1-1)。付加開始時期は、食事開始後数日間経過観察を行い、週末を挟むケースも含め、食事開始 3 日~6 日後であった。亜鉛付加の有無で、術後 1 日目と退院時の血清亜鉛値を比較検討した。また、術後 1 日目の血清亜鉛値の高低と食欲不振に何らかの関連性があるのか検討した。さらに、両群における平均在院日数について比較検討した。

#### 1. 2. 6 統計解析

研究における全てのデータに対し正規性の検定を行い、正規性が得られたものに関しては平均値±標準偏差で示し、得られないものは中央値 (四分位) を示した。術後の経過期間を被験者内因子、群を被験者間因子とする混合計画の二元配置の分散分析 (2-Way Mixed ANOVA) を行った。有意な交互作用がみられず、術後の経過期間が有意の場合、経過期間の多重比較を Bonferroni の補正にて行った。在院日数については、Mann-Whitney の U 検定を用い群間比較とした。統計解析は、IBM SPSS Statistics, Ver.22 for Windows (IBM Co. USA) を用いた。相関係数は Pearson 相関係数を用いた。有意水準は 5% 未満とした。

#### 1. 3 結果

対象 38 症例の男女比は 27 :11 で、平均年齢は 66.9 ±8.9 歳であった。対象症例における術前平均血清亜鉛値は、75.9±13.5  $\mu$ g/dL であった。術前血清亜鉛値と年齢には負の相関関係 ( $r=-0.049$ ) は見られなかった (Fig. 1-1.)。術前血清亜鉛値の基準値に満たない症例を 23 症例 (60.5%) 認め、うち 65  $\mu$ g/dL 未満の症例を 6 症例 (15.8%) 認めた。

亜鉛付加有群は 13 症例あり、その内訳は、症状有りが 5 症例 (喉のピリピリ感と温かい食事の臭いでの吐き気、舌に白苔が生じしみて食べられない、味覚が感じなくなっ

た、口内炎や喉が痛くて食べられない、喉が痛くて声が出ない等）と、症状は無いが食欲がないから食べられない症例が 8 症例であった。一方、亜鉛付加無群は、25 症例であった（Table 1-1）。

9 症例（原因の定かでない食欲不振 8 症例と味覚異常を訴えていた 1 症例）は、1～3 日間で食欲不振や味覚異常の改善がみられ半量以下の摂取量が 8 割から全量摂取へ改善した。その他、喉の痛みなどを訴えていた 4 症例は 4 日～7 日後に 8 割から全量摂取へ改善した。喉の痛みについては、消失しなかったが徐々に軽減された。一方、臭いでの吐き気や白苔、口内炎については、退院前には消失した。亜鉛入りゼリーを付加した期間は、全量摂取できるようになって付加を中止した症例と喉の痛みがあり退院時まで継続していた症例もあった。

術前血清亜鉛値において、亜鉛付加有と付加無群間において有意差は認めなかった（Fig. 1-2）。術後 1 日目の血清亜鉛値の低下を全症例で認めたが、亜鉛付加有の血清亜鉛値は亜鉛付加無群と同等に推移し、群間で差があるとは言えなかった。しかし日にちが経つにつれて食欲不振症状は改善した。そこで、退院前の血清亜鉛値の約半分である  $45 \mu\text{g/dL}$  以下まで低下していることが、食欲不振に影響しているのか比較した。術後 1 日目の血清亜鉛値が  $45 \mu\text{g/dL}$  以下の低い群と高い群に分け、それが食欲不振にどう影響しているか比較したが、 $p=0.087$  で、有意差は認めなかった（Table 1-2）。しかし血清亜鉛値の低い群（ $45 \mu\text{g/dL}$  以下）では約半数の患者が、食欲不振症状を訴えていることがわかり、血清亜鉛値が食欲不振に影響する可能性が示唆された。また、亜鉛付加により食欲の回復を認めた。また、平均在院日数をその中央値で評価した結果、亜鉛付加有群は付加無群と同程度であった。この際の平均在院日数は亜鉛付加無と同程度であり有意差は認めなかった（Fig. 1-3）。

Table 1-2 亜鉛付加の有無と術後1日目の血清亜鉛値高低群の比較 n=38

	食欲不振者 (亜鉛付加有)	非食欲不振者 (亜鉛付加無)	合 計
(術後1日目)	人, (%)	人, (%)	人, (%)
血清亜鉛値の高い群 (46 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 以上)	3, (18.8)	13, (81.2)	16, (100)
血清亜鉛値の低い群 (45 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 以下)	10, (45.5)	12, (54.5)	22, (100)

Pearsonのカイ2乗検定、 $p = 0.087$

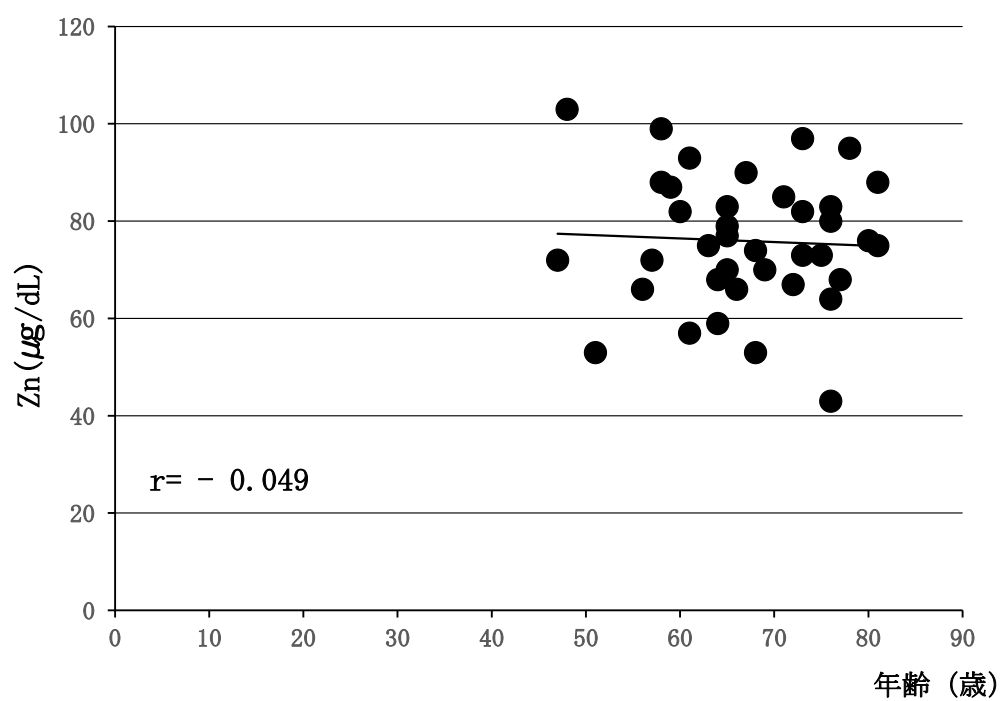


Fig. 1-1 術前血清亜鉛値と年齢の関係

Pearson 相関係数、  $p = 0.770$

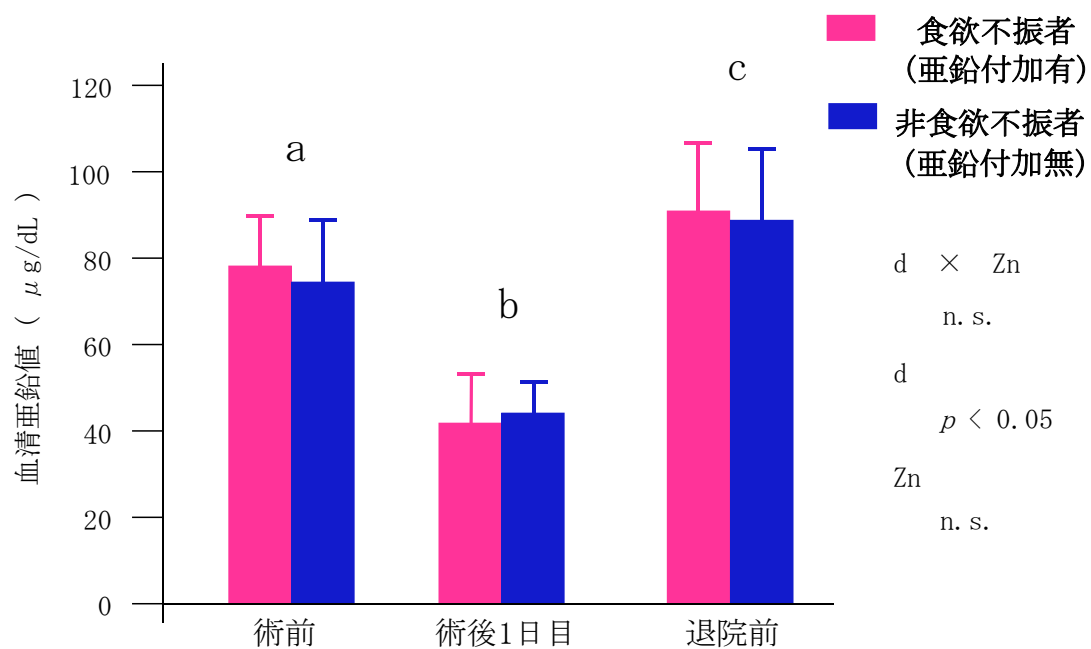


Fig. 1-2 血清亜鉛値の群間比較と経過日の比較

統計処理: 2-Way Mixed ANOVA

n. s. : 有意でない

a, b, c: 異なった文字間で有意差あり (Bonferroni)

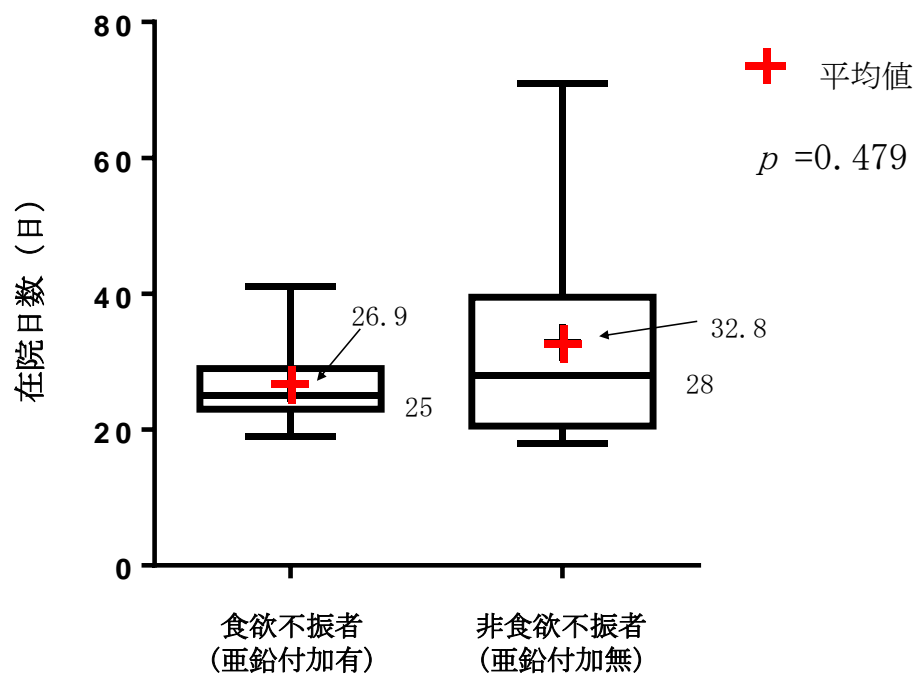


Fig. 1-3 亜鉛付加の有無と在院日数の比較

Mann-WhitneyのU検定



#### 1. 4 考察

今回の研究において、対象のほぼ全症例が、術前に 8 割から全量経口摂取が可能であった。しかしながら、術前血清亜鉛値が基準値に満たない症例が 60.5%におよび、倉澤ら<sup>10)</sup>、志村ら<sup>11)</sup>の報告と同様の傾向を示した。しかし日前ら<sup>6)</sup>、倉澤ら<sup>10)</sup>の報告のような血清亜鉛値と年齢の負の相関関係は見られなかった。原因としては症例の年齢が中年以降に偏っていたこと、また症例数が少なかったことなどが考えられた。「日本人の食事摂取基準（2010 年版）」<sup>12)</sup>によると成人における亜鉛の 1 日の推奨量は、男性 1 日 12 mg、女性 9 mg（妊婦・授乳婦は+2~3 mg）とされている。しかしながら、平成 24 年の国民健康・栄養調査<sup>13)</sup>によれば、通常の商品から得ている亜鉛 1 日摂取量は成人男性で平均 8.9 mg、女性で平均 7.2 mg であり、推奨量を充足していない現状がある。

消化管からの亜鉛吸収効率は約 30%前後といわれ<sup>14)</sup>、吸収の過程で鉄、銅、カルシウムなどと拮抗する<sup>15)</sup>。そのため、鉄や銅の吸収障害などが起り得るのではないかと懸念したが、実際には貧血症状の発症もなかった。今回は、亜鉛付加前後での、鉄や銅とカルシウムの測定を行っていないので、第二章で測定を行い、拮抗しているか否か調べることにした。血清亜鉛値の低下は、亜鉛摂取量の低下に加え、亜鉛を豊富に含有する野菜を栽培する環境の悪化、食品添加物摂取による吸収障害、ファストフードなどの食品を多量に摂取することによる栄養成分の偏りのほか、加齢による腸管からの吸収率の低下やサプリメント摂取や薬剤の副作用による吸収抑制効果が挙げられる。よって高齢者においては、より血清亜鉛低値の傾向にあることが推察される。術前の段階から血清亜鉛値の低い状態が前提にあり、侵襲の大きな手術によりさらなる亜鉛欠乏状態が引き起こされた結果、周術期の食欲低下に起因しているものと考えられる。

周術期での血清亜鉛値の変化については、開腹胃切除術 178 例（噴門側胃切除術・幽門側胃切除術・胃全摘術含む）における平均術前血清亜鉛値は 75.9  $\mu\text{g/dL}$  であったが、第 1 病日に 37.8  $\mu\text{g/dL}$  と著明に低下したとの報告<sup>11)</sup>がある。また、消化器手術における平均術前血漿亜鉛値は 69.8  $\mu\text{g/dL}$  であったが、術後 1, 2 日目では 34.2  $\mu\text{g/dL}$  と著明に低下し、合併症を併発せずに経過した症例では全例 1 週間以内に術前値に復し、合併症を起こした症例では、術後 5 日目を過ぎても血漿亜鉛値は低値を示し、回復と共に血漿亜鉛値も術前値に復したとの報告<sup>7)</sup>がある。今回の対象者は、消化管

の手術と比べると若干侵襲が低いのかかもしれないが、人工心肺装置を用いた手術であり、血清亜鉛値が下がるリスクは否めないと考えられた。

今回、術後食欲不振症例に経口的に亜鉛を付加することで食欲が回復し、周術期における血清亜鉛値のコントロールの重要性を示した。中でも、原因の定かでない食欲不振の症例では、亜鉛付加後 1～3 日間で 8 割から全量摂取できており、血清亜鉛値での有意差は出なかったものの、何らかの効果があつたのではないかと推測される。原因の定かでない食欲不振については、亜鉛を投与すると食欲が改善したという報告<sup>10)</sup>がなされており、当院でも肺炎治療で絶食であつた患者が、食事開始になつても食事が進まず血清亜鉛値を測定したところ  $59 \mu\text{g/dL}$  と低値であり、亜鉛入りゼリーを付加したところ、数日間で食欲が改善した症例<sup>8)</sup>もある。また逆に、高齢者の食欲不振の一つとして長年の嗜好が絡んでいる場合も多く、単なる好き嫌いによる食欲不振の場合もある。その症例の血清亜鉛値は基準値であることが多く、そういった症例に亜鉛入りゼリーを付加しても食欲は改善されない症例を経験している。

今回の研究では、亜鉛入りゼリーの付加によって食欲の回復を認めた。しかし血清亜鉛値での有意差が出ないのは、個々人に至適血清亜鉛値が存在し、その血清亜鉛値からある程度低下する状況で、亜鉛欠乏症が発症すると考えられている<sup>16)</sup>ためではないかと思われる。

在院期間を比較した統計結果としては、亜鉛付加有群は付加無群と同程度であつたが、当院の平成 24 年度（2012 年 4 月～2013 年 3 月）における平均在院日数は、弁置換術・弁形成術（28 症例）32.6 日、冠動脈バイパス移植術（17 症例）37.2 日であつたのに対し、亜鉛付加有群は、弁置換術・弁形成術は 28.5 日、冠動脈バイパス移植術は 24.2 日であり、弁置換術・弁形成術は 4.1 日、冠動脈バイパス移植術は 13.0 日短縮されていた。一方、亜鉛付加無群では、弁置換術・弁形成術は 31.4 日、冠動脈バイパス移植術は 32.6 日であり、弁置換術・弁形成術は平成 24 年度と同程度、冠動脈バイパス移植術は 4.6 日短縮されていたものの、亜鉛付加有群ほどではなかつた。このように食欲不振に対しそのまま経過を診ることは、在院日数の長期化をもたらす可能性があり、そうした症例数を減少させる意味でも経口的亜鉛摂取の意義はあるものと考えられた。

亜鉛は広く全身臓器組織内に分布し、細胞内に存在する微量元素としては最も多い<sup>15)</sup>。生理的機能として、多くの酵素活性に関与するとともに<sup>15, 17-18)</sup>、免疫能維持に関し

て重要な役割を担っている<sup>19)</sup>。今回の研究において術後 1 日目血清亜鉛値の低下が全症例に認められたことから、侵襲の大きな手術後は、全身の組織内での酵素活性や免疫維持に血液中の亜鉛が一時的に動員されている可能性も考えられた。また、急性心筋梗塞が発症した場合、2 時間以内に血清亜鉛値が著明に低下するといわれ<sup>15)</sup>、血清亜鉛値低下の程度が、予後の一つの指標となるという報告<sup>20-21)</sup>や、心筋梗塞に合併した不整脈の重症度にも関連するとの報告も見受けられる<sup>22)</sup>。また、心筋梗塞発症例において、極めて低い血清亜鉛値を認めた場合に亜鉛補充療法を施行することが回復の促進に繋がる可能性を示した報告もある<sup>20)</sup>。

今回の研究からも、経口的亜鉛付加による血清亜鉛値の改善が、術後回復期により影響を及ぼすものと考えられた。亜鉛欠乏は冠動脈疾患の危険因子として注目され、さらに生活習慣病の促進と老化促進への関与も示唆されている<sup>23)</sup>。2 型糖尿病における冠動脈疾患予防に亜鉛補充療法が有用であるとする報告<sup>24)</sup>もある。現代は糖尿病または境界型糖尿病に罹患している患者の症例数が増加しており、今後は手術症例に対する併存疾患の有無からの、血清亜鉛値の影響について注目していきたいと考えている。

## 1. 5 結論

手術の侵襲により血清亜鉛値は低下し、個々人によっては食欲不振を引き起こしていると考えられた。術後 1 日目の血清亜鉛値が低値で、なおかつ味覚異常や原因の定かではない食欲不振の訴えがあった場合には、亜鉛入り栄養補助食品を付加することによって、食欲の回復を認める可能性が示唆された。さらに血清亜鉛値の低下を防ぎ、血清亜鉛値の正常化を促進するものと期待できる。在院日数については、長期化の防止に繋がる可能性が示唆され、周術期における血清亜鉛値の低下を防ぐ取り組みが必要と考えられた。しかし二価陽イオンの吸収への影響については、少数の症例でしか検討していなかったため、症例数を増やして検討する課題が残された。

## 第二章 周術期の血清亜鉛値と亜鉛付加による他の2価陽イオンの吸収及び摂食量について

### 2. 1 目的

第一章では侵襲の大きな手術後の患者に、亜鉛入り栄養補助食品を付加することで血清亜鉛値が上昇するかどうか亜鉛入り栄養補助食品の有用性を検討したが、亜鉛の多量摂取と他の二価陽イオンの吸収障害の可能性についての問題が残された<sup>25)</sup>。そこで、亜鉛を付加することにより同じ2価陽イオンの吸収障害が起こり得るのか調べることにした。また、亜鉛入り栄養補助食品を付加することによってどの程度の食事が摂取できているのか、また食欲が変化しているか調べることにした。

### 2. 2 方法

#### 2. 2. 1 対象者

対象者は、第一章と同様仙台循環器病センターにおいて、2016年2月から2018年7月までの期間に冠動脈バイパス移植術又は弁形成術・弁置換術を施行した50症例である。本研究は、仙台循環器病センター倫理委員会の承認を得た後、対象患者およびその家族に研究目的・方法および倫理的配慮事項を文書かつ口頭にて説明し同意を得て実施した。対象者は開心術後の20歳以上の患者とし、かつ経口摂取可能な患者とした

Table 2-1 周術期の亜鉛付加研究（その2）の対象患者 n=50

	亜鉛付加有	亜鉛付加無	<i>p</i>
患者数（名）	28	22	
男/女(名)	19 / 9	14 / 8	n. s.
年齢（歳）	69 ± 10	68 ± 11	n. s.
術後2日目の 血清亜鉛値（μg/dL）	42.3 ± 12.0	40.2 ± 8.9	n. s.

平均値 ± 標準偏差

(Table 2-1)。食事内容は手術後に減塩食又は減塩軟菜食（以下;減塩食）を食べている患者とした。

## 2. 2. 2 採血

術後2日目（亜鉛付加前）と7日目、14日目に測定用採血（亜鉛・銅・カルシウム・鉄・プレアルブミン）を行った。血清亜鉛の測定は第一章と同様に行った。その他の項目の採血は血清亜鉛採血と同じタイミングで行ったが、採血管は通常使用されている真空採血管を使用した。検体はすべて(株) ビー・エム・エルへ委託し測定した。採血項目のそれぞれの方法と基準値は、血清亜鉛（Zn）は原子吸光分光光度法で行い基準値は80～120  $\mu\text{g/dL}$ 、血清銅（Cu）は比色法（3.5-DiBr-PAESA法）で行い基準値は66～130  $\mu\text{g/dL}$ 、血清カルシウム（Ca）は比色法（アルセナゾⅢ法）で行い基準値は8.6～10.2  $\text{mg/dL}$ 、血清鉄（Fe）は比色法で行い基準値は男性60～210  $\mu\text{g/dL}$ 、女性50～170  $\mu\text{g/dL}$ 、血清プレアルブミン（トランスサイレチン）はエフェロメトリー法で行い基準値は22.0～40.0  $\text{mg/dL}$ である。

## 2. 2. 3 食欲確認調査

また採血と同じ日に、管理栄養士による食欲確認を行った。食欲確認は、食欲確認用紙（Table2-2）を用いた、主観的食欲感覚の評価（Visual Analogue Scale (VAS)法）を行った。質問内容は①食欲の程度②体調③味や匂いの違和感の三種類のみとし、手術前と比較して現在どうであるかを10 cmの横線（左端が0、右端が10）に対し垂直な縦線を記入してもらった。0からの距離を測定しそれらを点数化した。点数が高い程、回復を示す。

Table 2-2 食欲確認用紙

食欲確認シート		
部屋番号	ID	氏名
●記入例を参考に、0 から 100 の間に縦線を引いて(横線を通して)教えて下さい。		
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">記入例</div>		
	0	50 100%
食欲がいつもの半分位の時なし		ふつう
体調があまりよくない時 悪い		良い
【介入日 年 月 日】		
① 食欲の程度は？	なし	ふつう
② 体調はいかがですか？悪い		良い
(身体の痛みや熱、吐気など)		
③ 味や臭いの違和感はある		なし
(味を感じない、口の中が変な感じ、臭いが気になるなど)		
【1 週間後 月 日】		
① 食欲の程度は？	なし	ふつう
② 体調はいかがですか？悪い		良い
(身体の痛みや熱、吐気など)		
③ 味や臭いの違和感はある		なし
(味を感じない、口の中が変な感じ、臭いが気になるなど)		
【2 週間後 月 日】		
① 食欲の程度は？	なし	ふつう
② 体調はいかがですか？悪い		良い
(身体の痛みや熱、吐気など)		
③ 味や臭いの違和感はある		なし
(味を感じない、口の中が変な感じ、臭いが気になるなど)		

#### 2. 2. 4 亜鉛給与量と群分け

減塩食には1日当たり亜鉛が10.2 mg 含まれ、一方亜鉛入り栄養補助食品（亜鉛入りゼリー）で亜鉛23 mg を付加した減塩食には1日当たり亜鉛が33.2 mg 含まれる。

対象者を2群に分け、亜鉛入りゼリーを付加した群（以下、亜鉛付加有と略）28人とプラセボの亜鉛付加なしゼリーを付加した群（以下、亜鉛付加無）22人とした。

#### 2. 2. 5 1日当たりの給与量

減塩食は1日当たり平均1500～1800 kcal、たんぱく質68～70 g。

#### 2. 2. 6 統計解析

研究における全てのデータは、平均値±標準偏差で示した。また、血清亜鉛値などの採血5項目や食欲確認の3項目、摂取カロリーと亜鉛付加の有無については、術後の経過期間を被験者内因子、群を被験者間因子とする混合計画の二元配置の分散分析(2-Way Mixed ANOVA)を行った。有意な交互作用がみられず、術後の経過期間が有意の場合、経過期間の多重比較をBonferroniの補正にて行った。有意な交互作用がみられた場合には、各術後の経過日数ごとに群間比較をt-testで行った。さらに群ごとの経過期間の多重比較をBonferroniの補正にて行った。

統計解析は、IBM SPSS Statistics, Ver.22 for Windows (IBM Co. USA) を用いた。相関係数はPearson 相関係数を用いた。有意水準は5% 未満とした。

### 2. 3 結果

血清亜鉛値の術後2日目、7日目、14日目の結果をFig. 2-1に示す。第一章と同様に経過と共に有意に上昇したが( $p<0.05$ )、群間での有意な差は認められなかった。次に血清二価陽イオン類の濃度の平均値を見ると、銅とカルシウム濃度は経過とともに両群とも上昇した (Fig. 2-2)。しかし、これらの変化には有意な差が認められず、鉄濃度の変化もほとんど見られなかったため、いずれの二価陽イオンとも、亜鉛付加によって吸収が妨げられていないものと推察された。また血清プレアルブミン値の平均値については、術後2日目は基準値以下となっていたが、7日目以降は正常値まで回復した。(Fig. 2-3)。次に血清亜鉛値とVAS法による違和感と体調指標の変化の結果を比較したところ、亜鉛付加の有無の2群間に有意な差は認められなかったが (Fig.

2-4)、体調では亜鉛付加有で術後 7 日目に平均値が高い値になっていた。さらに、VAS 法による食欲の程度については、Fig. 2-5 に示した。この指標にも有意な差は認められなかった。次に 1 日当たりの食事摂取量の変化について比較したところ、両群とも日にちがたつにつれて摂取カロリーは増加していた。さらに術後 7 日目でのみ、亜鉛付加有群の方が亜鉛付加無群と比較して有意に摂取カロリーが多かった (Fig. 2-6)。



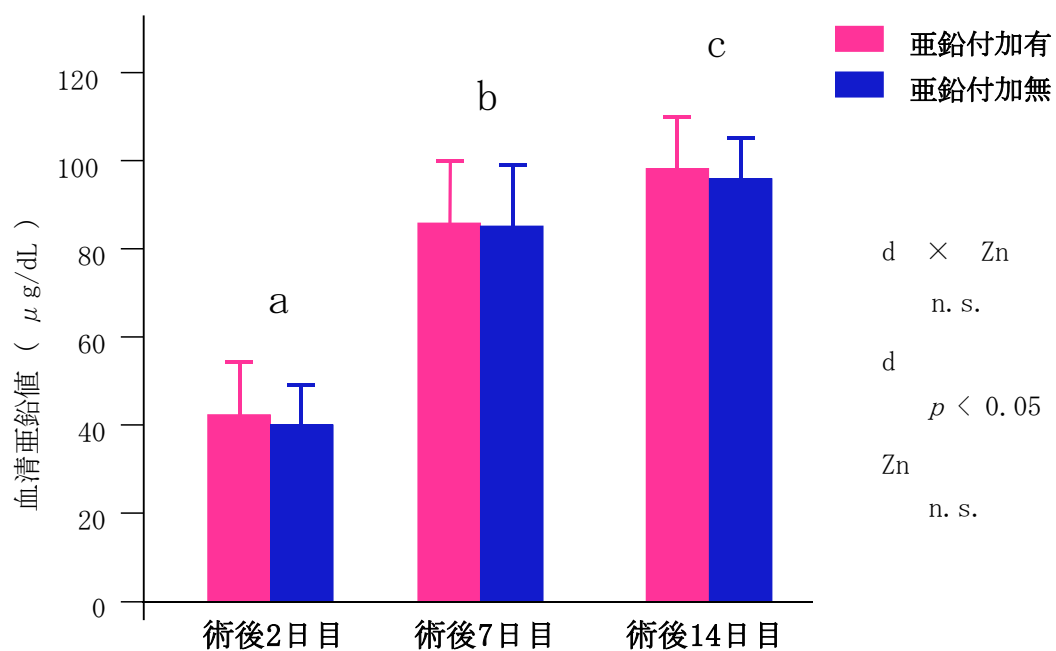


Fig. 2-1 血清亜鉛値の変化

統計処理: 2-Way Mixed ANOVA

n. s. : 有意でない

a, b, c: 異なった文字間で有意差あり (Bonferroni)

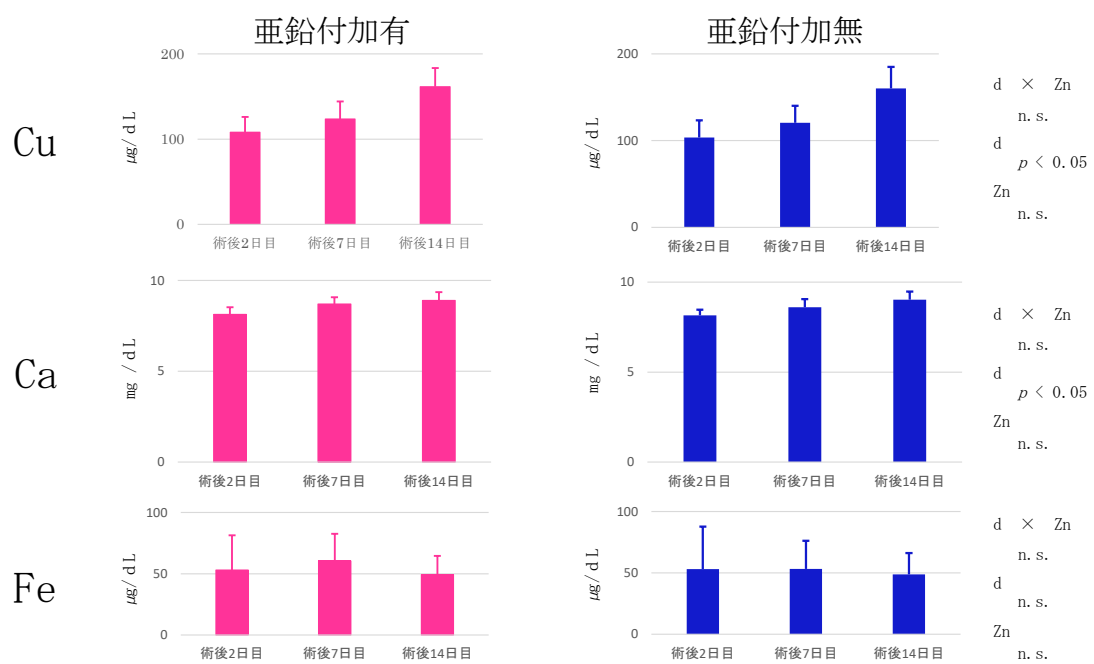


Fig. 2-2 血清2価陽イオン濃度の変化（2群間の比較）

統計処理：2-Way Mixed ANOVA

n. s. :有意でない

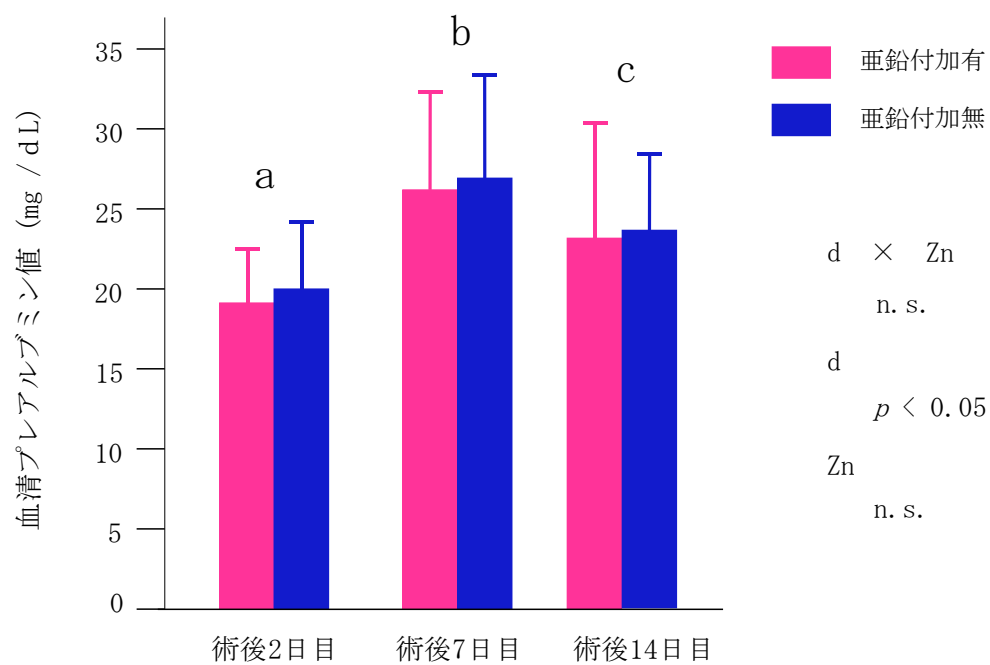


Fig. 2-3 血清プレアルブミン値の変化

統計処理: 2-Way Mixed ANOVA

n. s. : 有意でない

a, b, c: 異なった文字間で有意差あり (Bonferroni)

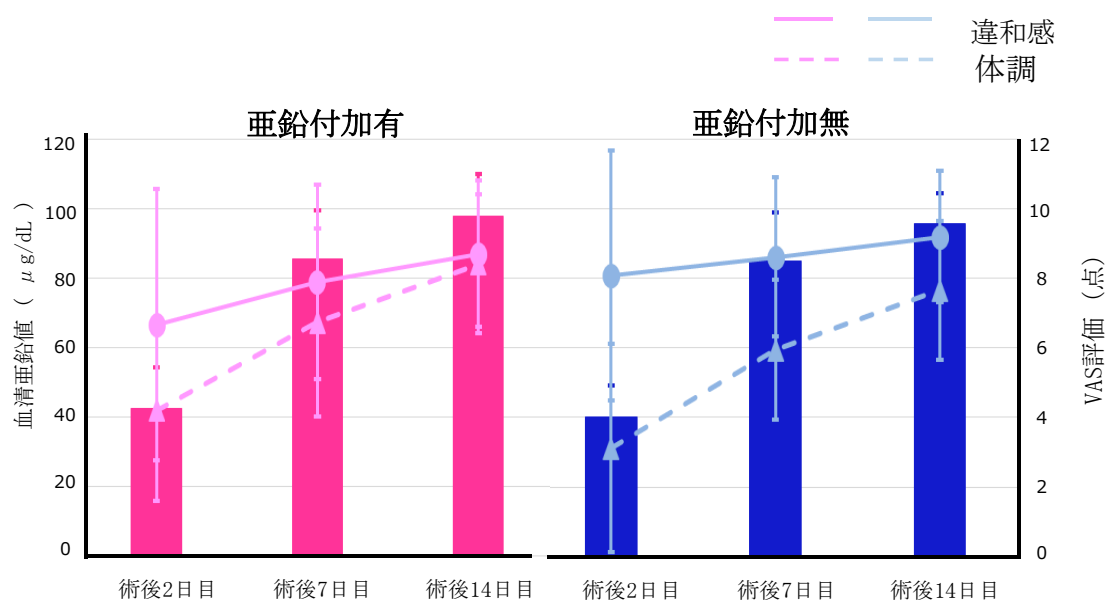


Fig. 2-4. 血清亜鉛値とVAS法による違和感・体調指標の変化

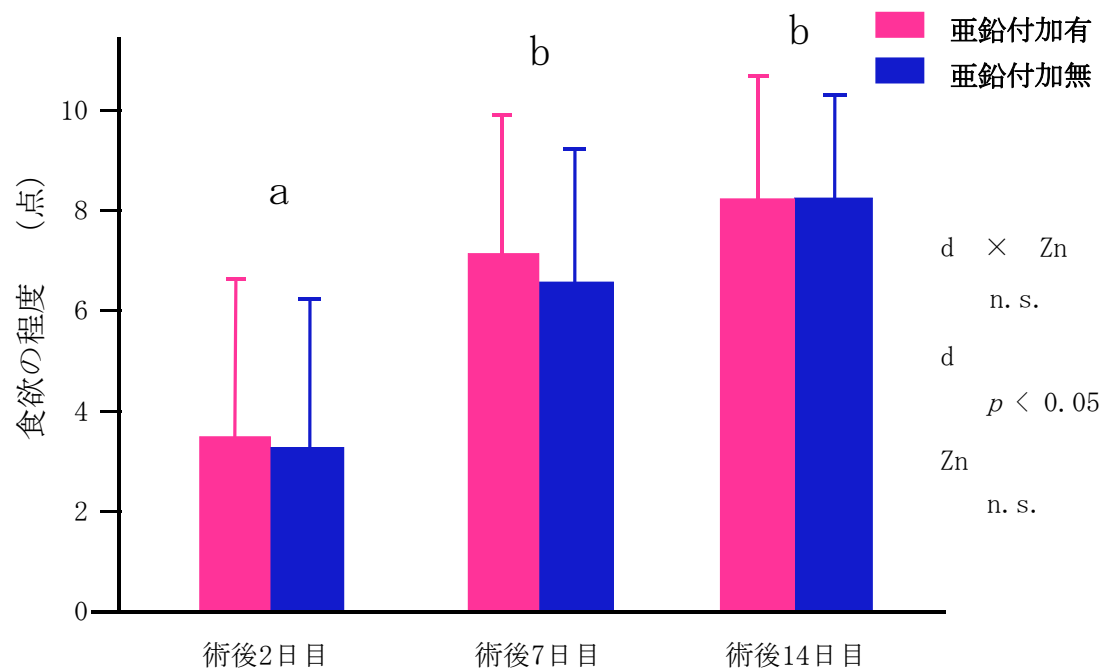


Fig. 2-5 VAS法による食欲の程度の比較

統計処理: 2-Way Mixed ANOVA

n. s. : 有意でない

a, b : 異なった文字間で有意差あり (Bonferroni)

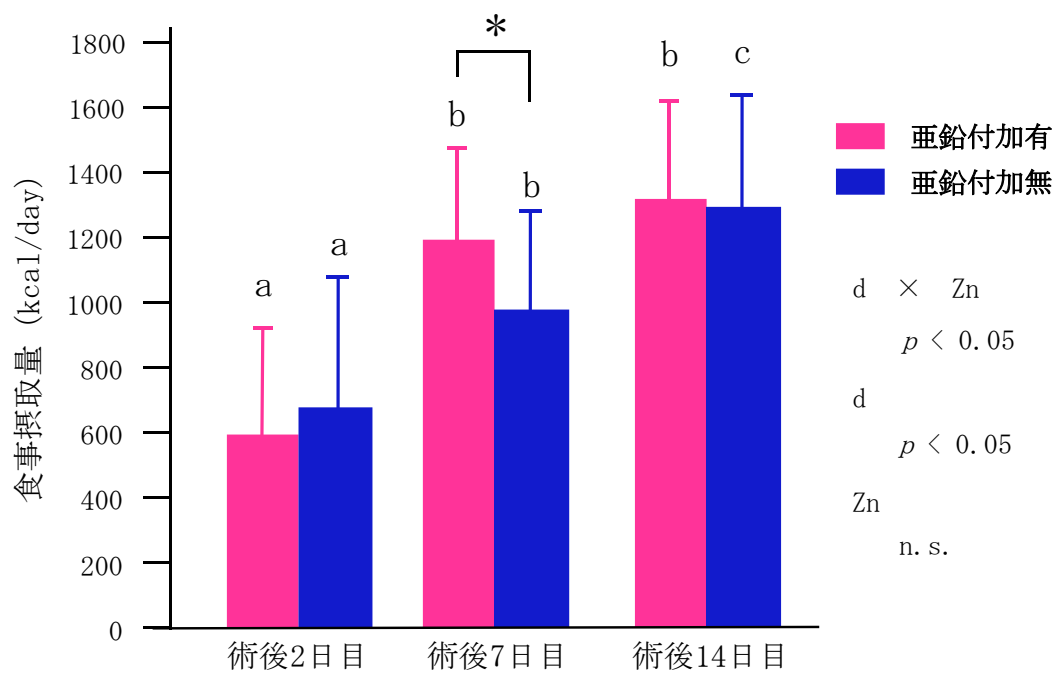


Fig. 2-6 1日当たりの食事摂取量の変化

統計処理: 2-Way Mixed ANOVA

n. s. : 有意でない

a, b, c: 異なった文字間で有意差あり (Bonferroni) \*  $p < 0.05$  (t-test)

## 2. 4 考察

今回の結果からも、侵襲の大きな手術後には血清亜鉛値は基準値の半分程度となり、亜鉛付加に関係なく経過と共に改善されることがわかった。また、亜鉛を付加することにより同じ 2 価陽イオンの吸収障害が起こると言われている<sup>26-28)</sup>が、今回の結果では 2 価陽イオンの吸収障害は見られなかった。その理由としては、今回の亜鉛付加量は、日本人の食事摂取基準 2015 年度の耐容上限量程度であったため起こらなかったのではないかと考えられた。むしろ血清銅の平均値は基準値より上昇していた。血清銅が上昇した理由としては、セルロプラスミン（血中で銅の運搬を担う）が上昇するのではないかと考えられた。セルロプラスミンは、炎症の急性期に血中に増加する蛋白成分（急性相蛋白質）の一つで、CRP 等より遅れて上昇する。

次に食欲への亜鉛付加の影響についてである。亜鉛付加の有無によって術後 7 日目という大事な時期において摂取量に有意な差が生じていた。亜鉛付加有群の方が 1 日当たり平均 200 kcal 多く摂取できていた。また、有意差にはならなかったが、患者自身が感じている体調や食欲という主観的な感覚においても違いが見られた。このことは、術後の回復に重要な意義をもつ。なぜなら現在の医療では、たとえ侵襲の大きな手術後でもその翌日から急性期リハビリが開始されるプログラムとなっている。従って術後 1~2 日目には点滴をつけながら起き上がりや立ち上がり、その数日後には歩行が試され同じ頃点滴も外され、7 日目にはリハビリ歩行が何百メートルと開始されている。このような状況では、身体は少しでも多くの栄養が必要とされる。しかし、術後の経口摂取が進まないと、摂食量補充のための静脈栄養を継続するかあるいは経腸栄養をせざるを得ない。静脈栄養法は感染のリスクが高いため、できれば必要最低限に抑えたい。このようなことから、術後早めに亜鉛付加を行うことは摂食量を担保し、最終的にはリハビリに効果をもたらすのではないかと考えられる。

今回、直近の栄養状態の評価に用いられるプレアルブミン（半減期 2~3 日）も測定した。予想では経過と共に上昇していくと考えられたが、平均値の結果では 14 日目は 7 日目より少し低下していた。この原因については、7 日目から 14 日目、退院に向けてリハビリの内容は強化されるため、血中の蛋白がより使われているのではないかと考えられた。今後は、体脂肪量、体水分量（細胞内・外水分）、筋肉量等の体成分を測定する装置「In-Body」<sup>29)</sup>を用いて、関連性を研究していきたいと考える。

## 2. 5 結論

周術期の血清亜鉛値は、術後に健常時の半分くらいまで低下するが、亜鉛付加の有無に関係なく経過と共に上昇した。また亜鉛付加による他の 2 価陽イオンの吸収障害は起こさなかった。摂食量においては、術後 2 日目と 14 日目では、同程度であったが、術後 7 日目において亜鉛付加有群が有意に多く摂取できており、このことは感染症のリスクを下げ、リハビリも行いやすくしていると考えられた。今後は、亜鉛付加と術後の筋肉量の関係について、さらにプレアルブミンの変化との関連性について研究していきたいと考えている。



## 第三章 亜鉛経口投与によるラットの摂食促進効果に関する脳視床下部メタボローム解析

### 3. 1 目的

亜鉛は多彩な生理機能を有する必須微量元素である。これまでの国内の研究では、亜鉛欠乏時のラットの摂食量のサイクルパターンが、玉木らによって報告されてきているが<sup>30-31)</sup>、どのようなメカニズムによって摂食量が減ったり増えたりするかについては、まだ解明されていない。よってこのメカニズムを解明するために当研究室から京大に移った大日向氏らと一緒に取り組み、消化管経路の食餌亜鉛摂食シグナルがあり、これが迷走神経介在の伝達経路で摂食調節中枢を修飾しているメカニズムであることを報告してきた<sup>3,32)</sup>。同様に Philippe L. らも、亜鉛の経口投与によって視床下部の NPY, Orexin などの摂食促進ペプチド mRNA 発現量の有意な増大が認められたと報告している<sup>33)</sup>。しかし、今のところ消化管における亜鉛シグナル受容・伝達メカニズムの詳細については不明である。よって、今回の研究では、上述と同じ実験系で亜鉛投与ルートの違いによる脳の摂食調節領域における摂食調節因子の代謝物の違いを、メタボローム解析によって解明しようとした。

### 3. 2 材料と方法

#### 3. 2. 1 材料

実験動物には、SD (Sprague-Dawley) 系雄ラット SLC:SD/SPF ; 日本エスエルシー株式会社) を用いた。ラットを 4 週齢 (体重 70~90g) で購入し、3~4 日間、市販固型飼料 (F-2 ; 船橋農場) と精製水で馴化させた後、実験に供した。飼育は、室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ 、12 時間 / 12 時間の明暗サイクル (08 : 00 点灯) に保たれた環境下で行った。実験は、国立大学法人東北大学動物実験等に関する規程に基づいて行った。また国立大学法人東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会の承認を得た。(2013-AgA-009)

実験飼料 (亜鉛欠乏飼料) は Table 3-1 に示した組成で作製した。ミネラル混合は Table 3-2 に示した亜鉛を含まない組成で独自に作製した。またビタミン混合の組成は Table 3-3 に示した。この飼料中の亜鉛含量は  $0.7 \mu\text{g} / \text{g}$  であった。実験群は、Zn-P0 (Zn-経口投与) 群、Zn-IP (Zn-腹腔内投与 = 非経口投与) 群、Saline-P0 (生理食塩

水を経口投与)群の3群を設け、全個体について個別飼育を行った。体重と摂食量は毎日測定した。

固型飼料で馴化後、亜鉛欠乏食を2日間与えた。一般に亜鉛欠乏食による飼育後、摂食量は2〜3日目で減少し、減少ピークの翌日には増加する。本研究では、この摂食量減少のピーク前日に解剖に供した。3日目の朝8時に飼料を取り除き、2時間絶食させた。その後、硫酸亜鉛溶液 ( $\text{ZnSO}_4$  3 mg /5 mL) を体重当り 5 mL /kg 投与した。Zn-P0 群、Zn-IP 群、Saline-P0 群の3群間での比較検討実験とした。試験溶液の投与後は再給餌し、3時間経過後に麻酔なしで断頭屠殺した。脳の各部位の特定は、Jacques らの報告<sup>34)</sup>と脳地図アトラス<sup>35)</sup>を参考にするとともに、共同研究者の大分大学の酒井久美子先生の御指導によって事前解剖練習も行った。希望頭部からは氷冷下で脳の視床下部、海馬、扁桃体を速やかに摘出し、ビーズ入りエッペンドルフチューブに入れ、速やかに液体窒素で凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。また胴体からは血液を採取した後、小腸上部(胃の下4cmで十二指腸、その下4cmで空腸)を摘出し生理食塩水で洗浄後速やかに液体窒素で凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。得られた血液は、遠心分離(3000rpm, 10min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) し、上清のみ(血漿)を $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

Table 3-1 実験飼料の組成

成分	g / kg 飼料
コーンスターチ	556.0
乾燥卵白	250.0
大豆油	50.0
スクロース	50.0
ミネラル混合(独自作成 Table 3-2)	40.0
セルロース	30.0
ビタミン混合*	20.0
L-メチオニン	3.0
D-ビオチン	0.016

\*Table 3-3

OYC配合(オリエンタル酵母工業株式会社)

Table 3-2 ミネラル混合(亜鉛不添加)

成分	含有量(g)
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.43
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	34.31
$\text{NaCl}$	25.06
Fe-citrate	0.623
$\text{MgSO}_4$	4.8764
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$	0.121
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.156
KI	0.0005
$\text{CaCO}_3$	29.29
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0025
セルロースパウダーで100gに調整する	

Table 3-3 オリエンタルビタミン混合

成分		含有量
ビタ ミン A ・ アセテート	IU	50,000
ビタ ミン D 3	IU	10,000
ビタ ミン E ・ アセテート	mg	500
ビタ ミン K 3	mg	520
ビタ ミン B 1 ・ 塩酸塩	mg	120
ビタ ミン B 2	mg	400
ビタ ミン B 6 ・ 塩酸塩	mg	80
ビタ ミン B 1 2	mg	0.05
ビタ ミン C	mg	3,000
D-ビオチン	mg	2
葉 酸	mg	20
パントテン酸カルシウム	mg	500
パラアミノ安息香酸	mg	500
ニコチン酸	mg	600
イノシトール	mg	600
塩化コリン	g	20
セルロースパウダーで100gに調整する		

(OYC配合ビタミン混合, オリエンタル酵母工業株式会社)

### 3. 2. 2 血漿亜鉛濃度の測定

亜鉛濃度の測定にあたり、血液サンプルは前処理無しでそのまま測定した。亜鉛濃度の測定は、原子吸光光度計 AAS-6800 (SHIMADZU) を用いた。亜鉛標準曲線の作成のために、亜鉛標準溶液を用いた (亜鉛標準液、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、和光純薬株式会社)。亜鉛標準曲線は、亜鉛濃度として 0 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲内で描いた。

### 3. 2. 3 メタボローム解析

冷凍保存した脳の 3 部位は、大分大学にてトリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 : GC-MS-TQ8040 (SHIMADZU, Kyoto, 以下 GC-MS/MS) を用いて測定を行った。GC-MS/MS 測定用試料調製は、ブライ & ダイヤー法<sup>36)</sup>を一部改変して行った。改変した内容は試料のスケールが現在と異なるため修正したが、水や有機溶媒の比率、2 段階で抽出する方法などは従来通りとした。有機溶媒を入れるまでは常に氷上で行いチューブは Eppendorf 2 mL を使用した。また試薬類は高純度のもの、水は MS Grade を使用した。

初めにチューブ (ビーズ・組織込み) 重量を計り、組織の重量のみを算出して、これで面積値を標準化した。組織に冷やしたリン酸緩衝生理食塩水 (カルシウム及びマグネシウムを含まないもの) 400  $\mu\text{L}$  を入れ、ビーズクラッシャーで 3200rpm 30sec かけた。次にメタノール 500  $\mu\text{L}$  にクロロホルム (以下 ;  $\text{CHCl}_3$ ) を 250  $\mu\text{L}$  添加し、Vortex に 2min かけ、さらに 2- イソプロピルリンゴ酸 (溶媒 : ミリ Q) を 5  $\mu\text{L}$  加え、5min 静置、次に  $\text{CHCl}_3$  を 250  $\mu\text{L}$  とミリ Q 水を 250  $\mu\text{L}$  加え、Vortex に 2min かけた。その後 14000rpm、5-7min (室温) で遠心分離した。

上清 500  $\mu\text{L}$  を 2 本とり新しいチューブへ移し、SpeedVac で 3hr 完全にドライアップした。次にメトキシアミン塩酸塩 (溶媒 : ピリジン) を 80  $\mu\text{L}$  添加し、Vortex 30sec 行い、Sonication 30sec 行い、ペレットが浮いたら完了とした。振とう後 (90min at 30  $^{\circ}\text{C}$ 、TAITEC BioShaker 200 回転) さらに MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide) 40  $\mu\text{L}$  を加え、Vortex に 30sec かけた。次に Shaking 30min at 37 $^{\circ}\text{C}$  (TAITEC BioShaker 200 回転)、14000rpm 5min at RT 行い、上清 80  $\mu\text{L}$  を慎重に取り GC/MS 専用バイアル (微量管使用) へ入れ、分析を行った。

分析条件は、Nishiumi らの報告<sup>37)</sup>を参考に、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 : GCMS-TQ8040 (島津製作所) と SHIMADZU, Smart Metabolites Database

のソフトウェアを使用し、水溶性画分 (DB-5 (Agilent), 469 化合物成分) について分析を行った。

GC カラムは DB-5 (30 m)、キャリアガスは He、制御モードは線速度 (39.0 cm/秒)、注入方法は スプリットレス、オープン温度は 100 °C (4 分) → (10 °C / 分) → 320 °C (11 分)、MS (EI 法)、イオン源温度は 200 °C、インターフェース温度は 280 °C、チューニングモードは標準、測定モードは MRM、ループ時間は 0.3 秒で実施した。

### 3. 2. 4 統計処理

分析後のデータは、東北大学にて筆者らがピーク確認及び修正を行い、その後大分大学にて多変量解析専用ソフトウェア SIMCA Ver. 13 (Umetrics, Umea, Sweden) を用いて変動代謝物の抽出を行った。実験データ (数値) は全て、平均値 ± 標準偏差 (means ± SD) で表した。t-test は IBM SPSS Statistics 22 (Armonk, NY, USA) で行った。

### 3. 3 結果

屠殺後に得られた血液の血漿亜鉛の測定結果を Fig. 3-1 に示した。また、sample 投与後断頭までの 3 時間に食べた亜鉛欠乏食の摂取量を Fig. 3-2 に示した。今回の結果では、Zn-IP 群と Zn-P0 群間で摂食量の有意な差がなかったが、これまで研究室で行ってきた実験では血漿中や肝臓中の亜鉛量で有意な差が見られなくても、Zn-P0 群のみが Zn-IP 群や Saline-P0 群よりも有意に摂食量が多かった (Supplemental Fig. 1 及び 2)。このことから、実験は継続し行った。

摘出した脳 (視床下部、海馬、扁桃体) はメタボローム解析に供した。SIMCA による Orthogonal Partial Least Squares-Discriminate Analysis (以下: OPLS-DA)<sup>38)</sup> で脳部位の特異性が保持されているかどうかを調べた結果を、Fig. 3-3 に示す。視床下部、海馬、扁桃体の 3 部位は各部位別にプロットされており、投与方法や投与物に影響されることなく明らかに異なる代謝をもつ組織として明確に分離され、この方法で部位別代謝を検討できることが示された。

次に食欲調節に関する視床下部における群間の違いを Fig. 3-4 に示す。Zn-P0 群は X 軸上方にプロットされたが、Zn-IP 群と Saline-P0 群は下方に集中しているという違いがみられた。

次に各 2 群間の多変量解析 (S-plot) の結果を示す (Fig. 3-5(a, b, c))。SIMCA の S-plot では代謝物がすべてプロットされ、縦軸が特徴的な成分の信頼性を表し、 $0.8 < p(\text{corr}) < 1.0$  または  $-1.0 < p(\text{corr}) < -0.8$  で有意差ありを示し<sup>38)</sup>、それぞれ比較した群間で大きく変動していた代謝物である。横軸は各化合物の量を表す。この 3 つの S-plot の中で大きな違いが示されたのは、Zn-P0 群と Zn-IP 群の S-plot であった (Fig. 3-5(d))。この Zn-P0 群と Zn-IP 群間では、有意に変動した代謝物の違いが多くみられた (Table 3-4)。Zn-P0 群で有意に増加していたものはシチジン-4TMS、ドーパミン-4TMS、ビオチン-3TMS、3-アミノプロパン酸 ( $\beta$ -アラニン)-2TMS と 3TMS、ヒポタウリン-3TMS、等で観察された。一方 Zn-IP 群では、P0 群と比較して量は少ないが増加していたのは、2-デオキシグルコース-meto-4TMS、スクニシルアセトン-meto-TMS (3)、ドーパミン-3TMS、ウレイドプロピオン酸-2TMS で観察された。さらに KEGG マップによる Pathway 解析を行った結果、 $\beta$ -アラニンの代謝経路とその近傍にあるドーパミンの代謝経路がヒットした (Fig. 3-6)。これらのうち明確な差が認められた代謝物の量的な違いを Fig. 3-7 に示した。その結果、3-aminopropanoic acid-3TMS ( $\beta$ -アラニン)、ヒポタウリン-3TMS、ドーパミン-4TMS、ビオチン-3TMS とも Zn-P0 群で有意に多くなっている現象が確認された。



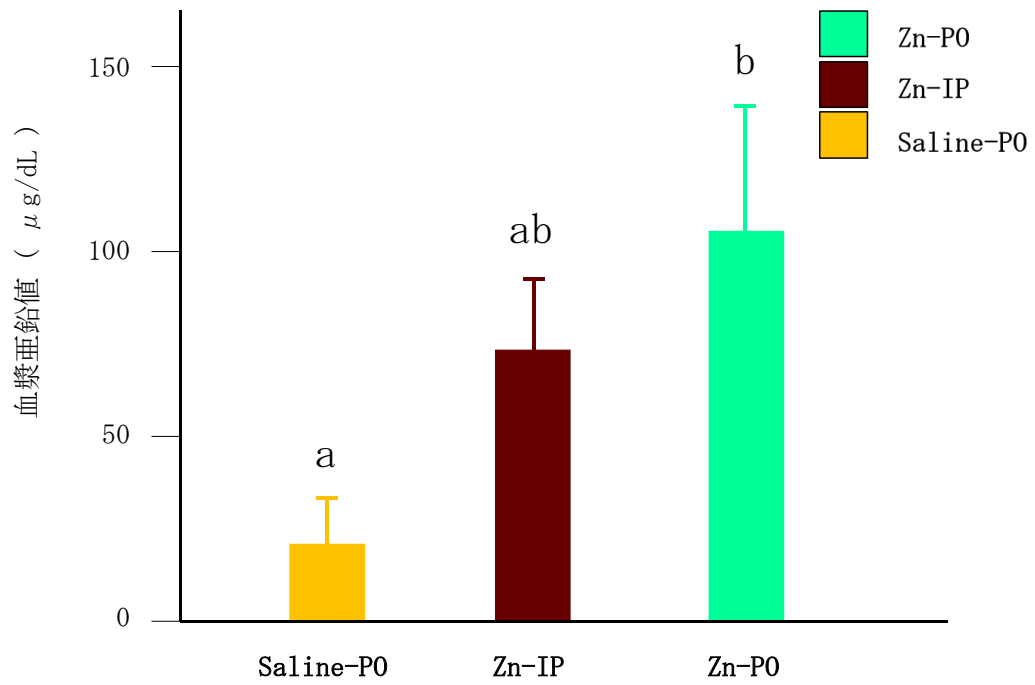
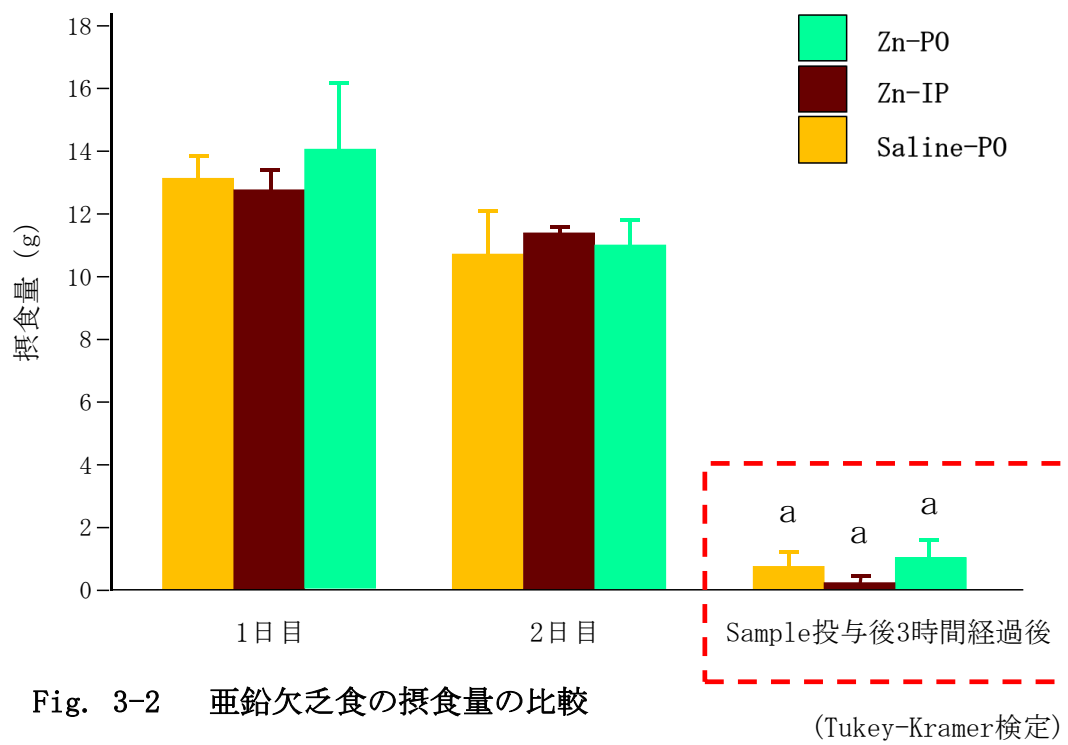


Fig. 3-1 屠殺時の3群の血漿亜鉛値

a, b: 異なった文字間で有意差あり  $p < 0.05$

(Tukey-Kramer検定)



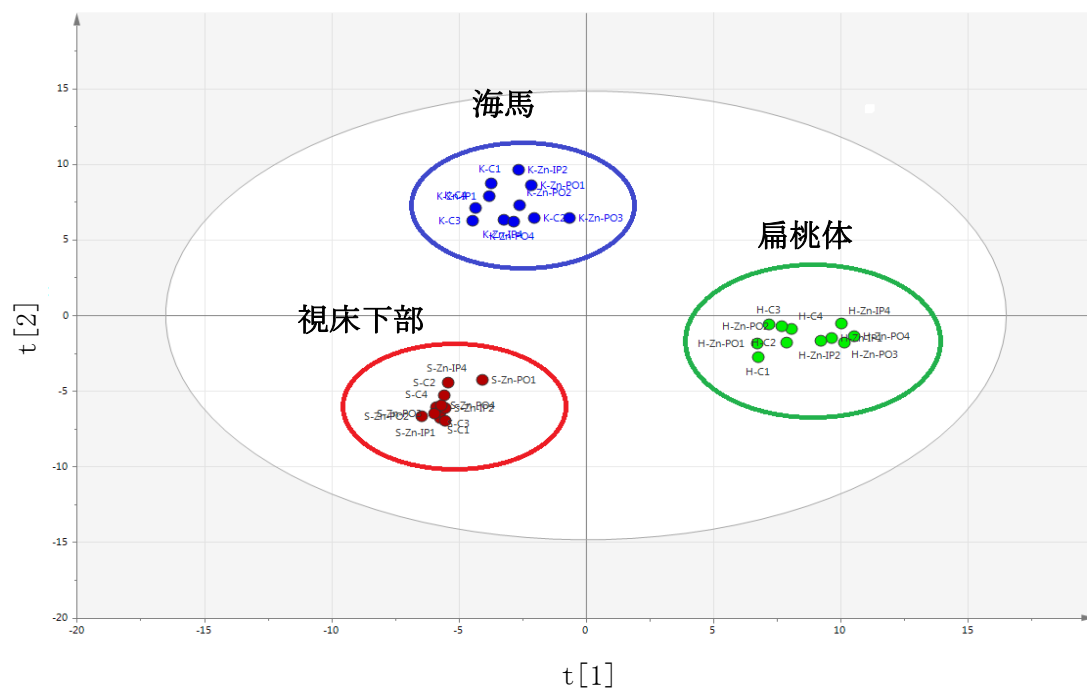


Fig. 3-3 脳3部位の水溶性画分代謝物の判別分析 (OPLS-DA)

Nishiuchi M, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 82, 2168-2175 (2018)より引用

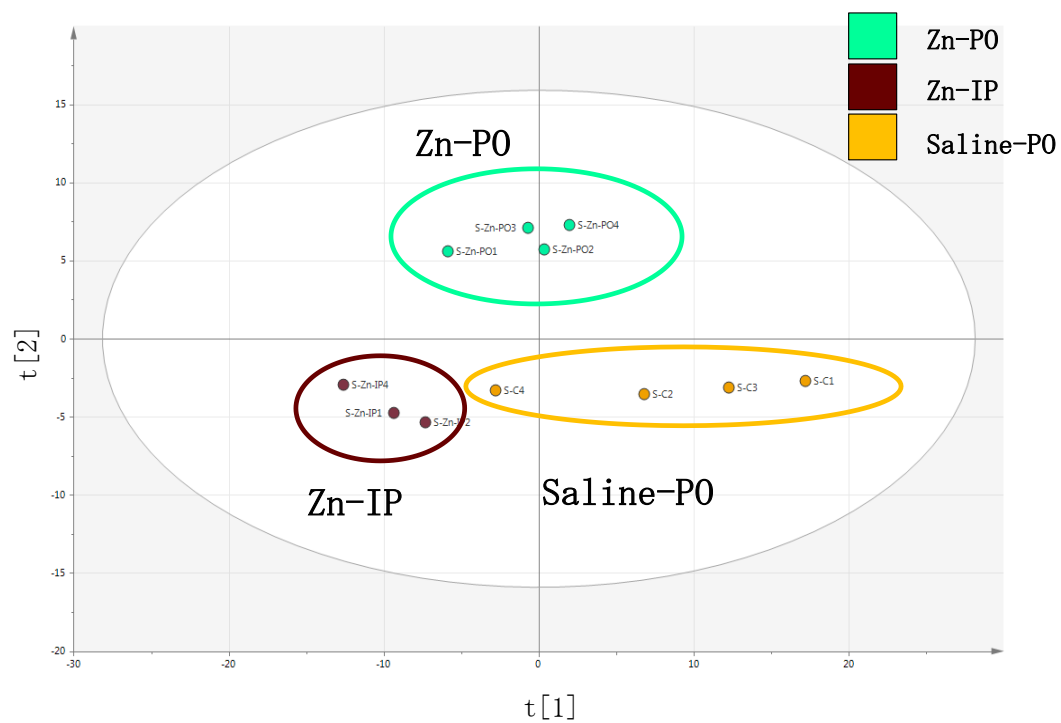


Fig. 3-4 視床下部における代謝物の判別分析 (OPLS-DA)

Nishiuchi M, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 82, 2168-2175 (2018)より引用



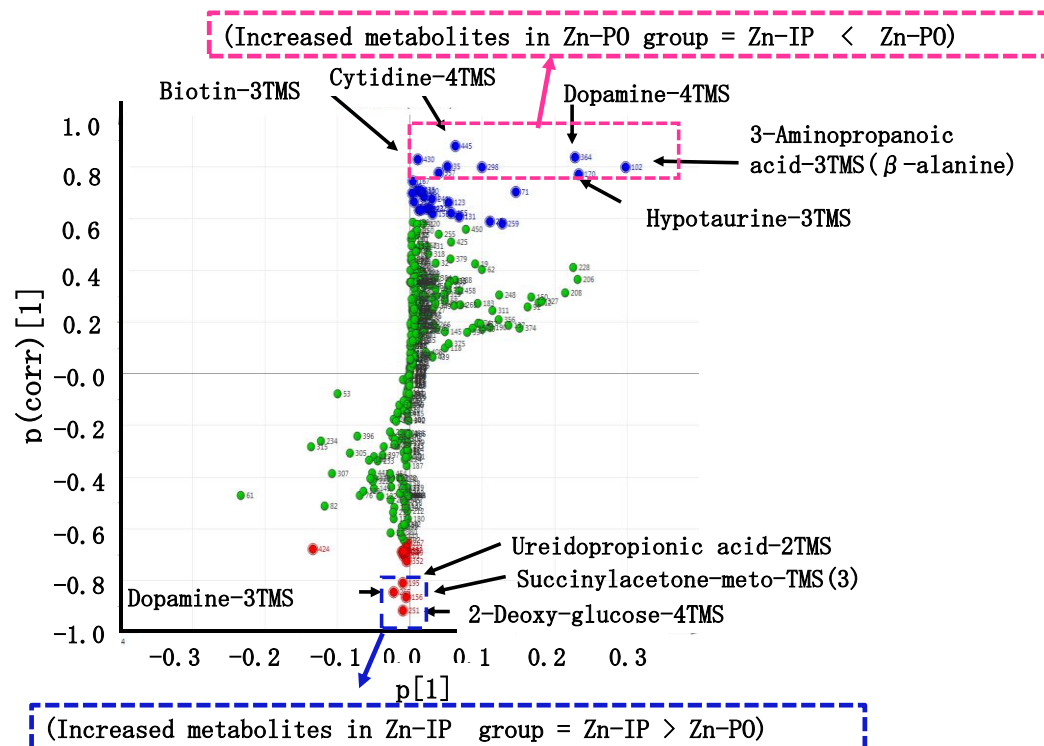


Fig. 3-5(d) 水溶性画分の変量解析(S-plot)

Nishiuchi M, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 82, 2168-2175 (2018)より引用

Table 3-4 S-plot 解析において群間で有意差が認められた代謝物一覧

Zn-IP Group				Zn-PO Group			
Var ID (Primary)	Var ID	$p[1]$	$p(\text{corr})$	Var ID (Primary)	Var ID	$p[1]$	$p(\text{corr})$
251	2-Deoxy-glucose-meto-4TMS <sup>†</sup>	-0.00899542	* -0.917139	445	Cytidine-4TMS <sup>††</sup>	0.0631305	* 0.879860
156	Succinylacetone-meto-TMS(3)	-0.00497275	* -0.865848	364	Dopamine-4TMS <sup>††</sup>	0.2282640	* 0.836879
265	Dopamine-3TMS <sup>†</sup>	-0.02177130	* -0.846739	430	Biotin-3TMS <sup>††</sup>	0.0108451	* 0.826578
195	Ureidopropionic acid-2TMS <sup>†</sup>	-0.00905359	* -0.809843	35	3-Aminopropanoic acid-2TMS <sup>††</sup>	0.0522016	* 0.801198
352	Urocanic acid-2TMS	-0.00444033	-0.724927	102	3-Aminopropanoic acid-3TMS <sup>††</sup>	0.2981310	* 0.798292
201	N-Acetylaspartic acid-3TMS	-0.00846077	-0.702282	298	Sorbose-meto-5TMS(2) <sup>††</sup>	0.0992909	* 0.798217
369	Dopa-4TMS	-0.00391001	-0.692283	357	Octopamine-4TMS <sup>††</sup>	0.0402043	0.775087
402	Metoprolol-2TMS	-0.01059570	-0.691026	170	Hypotaurine-3TMS <sup>††</sup>	0.2329970	0.770698
435	Docosahexaenoic acid-TMS	-0.00887977	-0.686056	167	3-Hydroxyphenylacetic acid-2TMS	0.0043258	0.742548
152	3-Methylcrotonylglycine-2TMS	-0.00532092	-0.684791	235	Fucose-meto-4TMS(2)	0.0118107	0.711274
424	Inositol phosphate-7TMS	-0.13329400	-0.679711	214	Xylitol-5TMS	0.0122422	0.704859
333	Glucuronic acid-meto-5TMS(1)	-0.00540082	-0.674209	400	Tryptamine-3TMS	0.0170392	0.703800
267	4-Aminobenzoic acid-2TMS	-0.00342282	-0.655633	71	4-Aminobutyric acid-2TMS	0.1467530	0.702220

Var ID, variable identification;

\*,  $0.8 < p(\text{corr}) < 1.0$  or  $-1.0 < p(\text{corr}) < -0.8$ , indicating that the data are statistically significant.

<sup>†</sup>, significantly increased metabolites compared with Zn-PO group. ( $p < 0.05$ , by Student's t-test.)

<sup>††</sup>, significantly increased metabolites compared with Zn-IP group. ( $p < 0.05$ , by Student's t-test.)

Nishiuchi M, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 82, 2168-2175 (2018)より引用

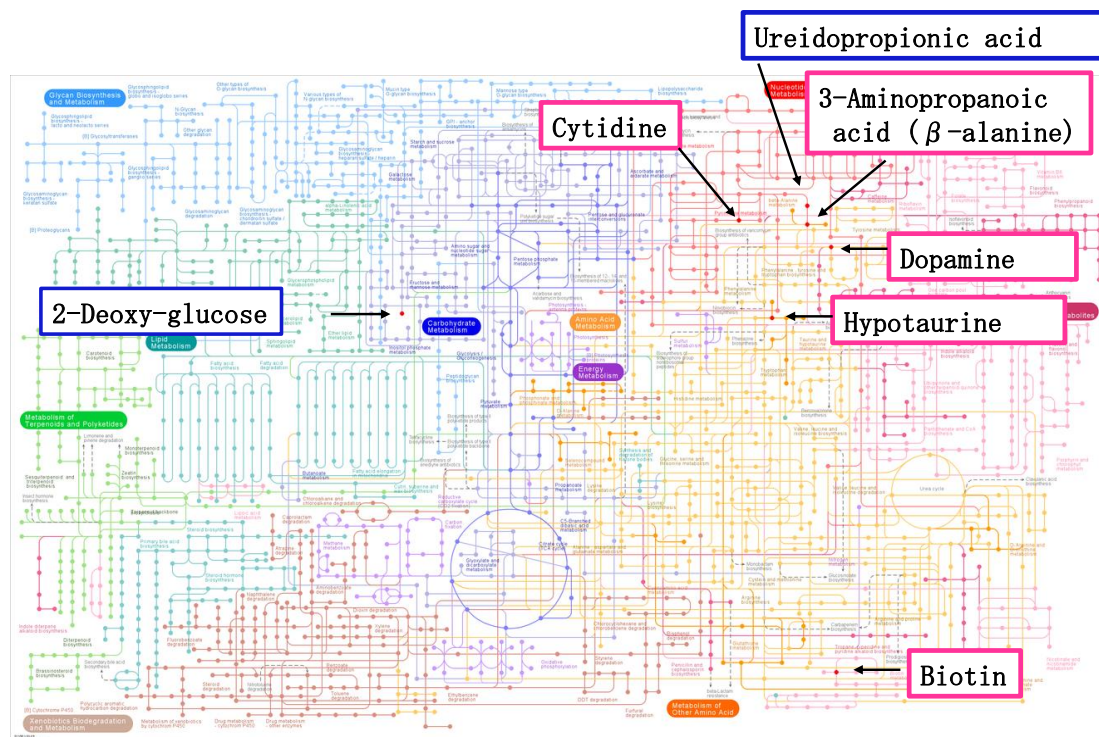
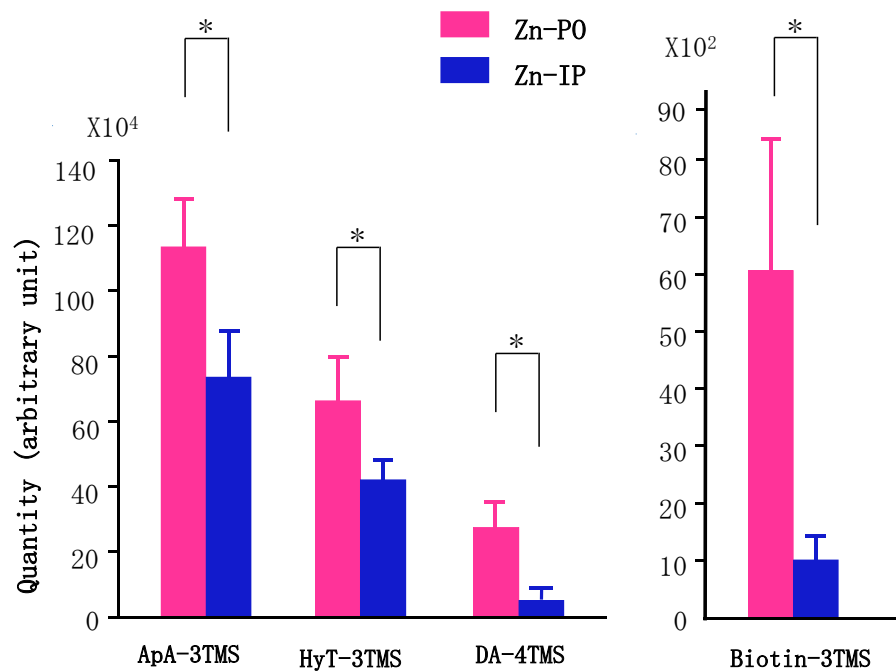


Fig. 3-6 KEGGマップによるPathway 解析

Nishiuchi M, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 82, 2168-2175 (2018)より引用





ApA: 3-aminopropanoic acid    HyT: Hypotaurine    DA: Dopamine

Fig. 3-7 Zn-P0とIP群で違いがみられた代表的代謝物

\*  $p < 0.05$  (t-test)

Nishiuchi M, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 82, 2168-2175 (2018)より引用

### 3. 4 考察

我々のこれまでの研究<sup>3)</sup>では、亜鉛欠乏食給餌ラット（短期亜鉛欠乏状態）において腹腔投与では増加しなかった摂食量が、亜鉛の経口投与では増加することを報告してきた。また亜鉛の経口投与後、視床下部における NPY、orexin などの摂食促進ペプチドの mRNA 発現量の増加が認められた。さらに迷走神経を遮断してみたところ摂食量の上昇は認められなかったことから、迷走神経を介して信号が送られていることを明らかにしてきた。そしてその信号は食物摂取をコントロールしている視床下部<sup>39-40)</sup>に送られていると言われている。しかしこの視床下部食物摂取調節の詳細なメカニズムははっきりしないままである。そこで、今回はこれまでと同じ実験系で亜鉛投与ルートの違いによる脳の摂食調節領域における摂食調節因子の代謝物解析を、GC-MS/MS を用いたメタボローム解析により行った。

脳の摘出にあたっては視床下部、海馬、扁桃体それぞれ 3 部位の特徴の違いを多変量解析によって確認した (Fig. 3-3)。食欲の調節については、1940 年代からの研究により、視床下部が摂食行動の中樞であることが明らかとなってきた。摂食中枢は外側野 (LHA) にあり、この部位の破壊で無飲無食が起り、刺激で摂食が誘発されることから名付けられた<sup>41)</sup>。この部位の神経細胞の刺激により摂食行動の誘発だけでなく、迷走神経の活動が促され、唾液、胃酸、インスリン分泌が促進する。そこで、今回は視床下部に焦点を当てて解析した。視床下部代謝物質は、Fig. 3-4 で示したように、Zn-P0 群は X 軸より上部に Zn-IP 群と Saline-P0 群は下部へそれぞれ分類され、各群間のはっきりとした代謝物の違いを明らかにした。

次に視床下部のそれぞれの群を 2 群間で比較した結果を S-plot で示した (Fig. 3-5-a, b, c)。このプロットでは、縦軸で  $|0.8|$  (絶対値) から  $|1.0|$  (絶対値) の間にあるものが群間に有意性があると判断される。また横軸の分布は 2 群間の量的な違いを示す。Zn-P0 群と Saline-P0 群、Zn-IP 群と Saline-P0 群の S-plot では有意性がある代謝物は少なく、あっても量的に少なかった。しかし Zn-IP 群と Zn-P0 群の比較 (Fig. 3-5-d) では、Zn-P0 群では  $\beta$ -alanine (3-aminopropanoic acid)-3TMS・-2TMS、Hypotaurine-3TMS、Dopamine-4TMS などが多くみられ、他に Biotin-3TMS も多くみられた。Zn-IP 群においては Dopamine-3TMS のみが増加していた。代謝物の名前の後半の TMS とは、トリメチルシリル化の略で数字は誘導体化された残基の数を示す。これらの結果より視床下部では、Zn-P0 群と Zn-IP 群間には大きな違いが見られた。

ドーパミンの増加の一つとしては、血中や組織中に亜鉛が増えると、ドーパミンが D1 レセプター (D1r) と D2 レセプター (D2r) と結合するのを亜鉛が阻害させることで、ドーパミンの活性化を抑制させる<sup>42-43)</sup>。これによって、ドーパミンが有する摂食阻害作用を抑制することが考えられる。今回のデータから、経口投与によって小腸上皮細胞に入った亜鉛が全身に回ることで標的組織の D1r と D2r に一部結合して、結合できなかった遊離のドーパミンが組織中 (視床下部) に増えたのではないかと想定されるが、なお説明が必要である。

二つ目の可能性は、中枢神経系におけるドーパミントランスポーターの関与である。これはドーパミンをシナプス間隙から汲みだし周囲の細胞に輸送するタンパク質である。実際にヒトのドーパミントランスポーターには亜鉛高結合性の細胞外亜鉛結合サイトがあり、亜鉛が結合するとドーパミンの再取り込みを抑制する<sup>44-46)</sup>。また、亜鉛は食欲の増減の感覚を刺激するセレトニンの合成に必要とされている点も関係しているかも知れない。これらのことは、亜鉛が食欲抑制を解除するという報告と一致する<sup>42)</sup>。今回のデータから、亜鉛欠乏食給餌 2 日目で発現量が上昇している ZIP4<sup>47)</sup> の状態があるために経口投与によって吸収されやすい状況にある。よって血流や組織中に上昇した亜鉛がドーパミントランスポーターに結合しやすい状況が考えられる。これによって細胞外ドーパミンが増えた可能性がある。

次に  $\beta$ -アラニンと亜鉛の関連性を調べるために MetaboAnalyst というソフトウェアで MSEA という方法でパスウェイ解析したところ、Zn-Po 群で  $\beta$ -アラニン代謝経路が有意にヒットした。 $\beta$ -アラニン代謝経路では、代謝物として  $\beta$ -アラニン、オキシグルタル酸、ジヒドロウラシルがあり、 $\beta$ -アラニン生合成に関与する酵素 beta-Ala-His dipeptidase と  $\beta$ -アラニン・ジヒドロウラシル間の経路の beta-ureidopropionase と dihydropyrimidinase 合計 3 つの亜鉛結合蛋白質が関係していることが確認された。その他、アラニン代謝経路においても、オキシグルタル酸がヒットし、Alanine-tRNA ligase の cytoplasmic と mitochondrial の 2 つの酵素が亜鉛結合蛋白質であった。さらにビオチン酵素であるピルビン酸からオキサロ酢酸への酵素ピルビン酸カルボキシラーゼが関連していた。

beta-Ala-His dipeptidase は、脊椎動物の脳内に多くあるアンセリンやカルノシンの生合成に関わっているが、それらのジペプチドと食欲の間に何らかの関係があるか否かについて、直接的な関係は見つけられなかった。また、過去の我々の研究でも、

短期の亜鉛欠乏状態の場合は血清中の亜鉛は低下するが、脳内の亜鉛は低下しないことがわかっているため、食欲に関しては別ルートにより影響をきたしていると考えられた。文献も検索したが、 $\beta$ -アラニンと視床下部の二つについては亜鉛との関連性の文献は見つけられなかった。ただし、 $\beta$ -アラニンはドーパミン代謝に関係していると言われてきているので、今後の検討課題と考える。

視床下部 AMP-activated protein kinase (以下 ; AMPK) は、栄養素やホルモン、神経伝達物質からの情報を神経細胞内での代謝変化などを介して統合し、摂食行動を制御していると言われている (Fig. 3-8)<sup>48-49)</sup>。具体的には、摂食促進因子 (グレリン、AgRP、絶食など) によって活性化した AMPK は acetyl-CoA carboxylase (以下 ; ACC) をリン酸化し活性を抑制する。その結果、ACC の産物であるマロニル CoA 量が減少してカルニチン・パルミトイルトランスフェラーゼ 1 (以下 ; CPT1) への抑制作用が解除され CPT1 活性が上昇し、脂肪酸  $\beta$  酸化が亢進し摂食が亢進するとされている (Fig. 3-9)<sup>50)</sup>。Zn-PO 群でみられたビオチンレベルの増加について、AMPK シグナルパスウェイから考察すると、ビオチンは ACC の補酵素としてその作用を示し、ACC の活性化が進むとマロニル CoA 量は増加し、CPT1 が抑制され、脂肪酸生合成へと進み食欲は低下する<sup>51)</sup>。一方 AMPK はセリン/スレオニン残基のリン酸化によっても活性化されるが、活性化した AMPK は、ACC をリン酸化することによりその活性を抑制し、摂食が亢進するとされている<sup>52)</sup>。従ってこれらの事実を考慮して、視床下部のビオチン増加のメカニズムについては今後さらなる解明が必要である。しかし、AMPK による ACC のリン酸化は ACC の不活性化をもたらすことはよく知られている。そして ACC と結合したビオチンが遊離することが最近の研究で明らかにされている<sup>52)</sup>ので、この点にも着目していく必要がある。さらに亜鉛と AMPK シグナルパスウェイについては、水中の環境への亜鉛添加によって、魚 (*Synechogobius hasta*) で AMPK が上方制御されるという重要な発見が肝臓の一部を用いて報告されている<sup>53)</sup>。

亜鉛は消化管に入ってくると近位小腸において吸収される。胃壁から分泌されるグレリンは、視床下部で NPY 分泌を亢進して摂食増進作用を発揮しているが<sup>54)</sup>、これは AMPK 経路の活性化によると言われている<sup>48-50, 55)</sup>。今回の結果より食餌性亜鉛がグレリン分泌を上げ AMPK に対する摂食因子となった、又は亜鉛自身が AMPK を活性化することで AMPK—ACC—CPT1— $\beta$  酸化の代謝へ影響をもたらしたのではないかと考えられた。さらに、若齢ブタへの食事性亜鉛 (ZnO) 投与は、胃壁からのグレリン分泌を上昇させ

たデータとの整合性がある<sup>56)</sup>。この報告では胃粘膜細胞（視床下部の NPY-mRNA の発現が経口からの亜鉛投与方法により増加したという我々の研究室の報告と一致したメカニズム）で、ZnO が直接刺激しグレリン産生を増加すると結論づけていた。しかし、そのメカニズムは将来の実験で証明していかなければならない。

外科侵襲早期における経腸栄養と経静脈栄養の違いについて、手術後の蛋白代謝や免疫能に与える効果を胃切除ラットを用いた研究がある。その研究では、手術後の経腸栄養は腸のタンパク質合成と免疫力を強化し、経腸栄養群は経静脈栄養群より腸管免疫能と全身免疫能のいずれにもよく保持することが報告された<sup>57)</sup>。ヒトにおいても侵襲の大きな手術、開胸術又は冠動脈バイパス術を受けた患者で、経口からの亜鉛補給は、術後の食欲を改善した<sup>25)</sup>。この他にも胃切除術患者において手術前の血清亜鉛値と手術後の合併症との関連を調べた報告がある<sup>11)</sup>。この研究では手術後の食事開始時には亜鉛入り栄養補助食品を付加していた。しかし、手術前の血清亜鉛値が低い群では亜鉛補給していても炎症性術後合併症の発生率が高い傾向にあった。また手術後には西内らの研究<sup>25)</sup>と同様に血清亜鉛値は大きく変動しており、亜鉛補充も考慮に入れた周術期管理が必要であると報告している。

亜鉛の摂食シグナルについては、早期シグナルと遅いシグナルがあり、前者は小胞体介在性またはメタロチオネインによるもので、後者は遺伝子発現を介したものであり、2系列あると報告されている<sup>58)</sup>。しかし今回の実験では亜鉛欠乏食 2～3 日目のあたりの亜鉛経口（胃内）投与とその 3 時間後のサンプリングのため、小腸上皮細胞では亜鉛が吸収されやすくなっており ZIP4 発現量が上がっていたと考えられた。このことはすでに神戸らも報告している<sup>47)</sup>。すなわち、亜鉛を経口投与して 3 時間後のサンプリングである今回の実験は、より短時間のうちに管腔側から小腸粘膜を介して亜鉛が入ってくる可能性の方が高いと考えられた。従って小腸上皮細胞内で一時的にたくさん取り込まれた亜鉛は、視床下部への血液循環系へ又は胃腸迷走神経シグナル伝達を経て、奏効しているのかもしれない。これまでに消化管での亜鉛吸収に寄与するトランスポーターの生理機能や発現制御機構が近年明らかになってきた<sup>59)</sup>ものの、小腸上皮細胞内での亜鉛シグナル( $Zn^{2+}$ )がどのようにすばやく受け取られ、各組織に伝達されるのかについては今後明らかにしていく必要がある。

消化管から発信されるエネルギー代謝情報のシグナル因子としては、食事応答性に腸管から分泌される種々のペプチドが挙げられる。このことは既に発表しているが<sup>32)</sup>、

今回の結果を受け、経口からの亜鉛摂取が消化管で何らかの合図を引き起こしていると推測された。亜鉛経口投与群では視床下部の 3-aminopropanoic 酸 ( $\beta$ -アラニン)、ヒポタウリン、ドーパミン、ビオチンの濃度が有意に増加していた。このことはラットを用いて食物摂取コントロールに関する視床下部での代謝物プロファイルの変化を初めて明らかにしたものである。

以上、今回の実験では、亜鉛を経口投与することによりグレリンなどのペプチドホルモンの増加が視床下部へ伝わり、さらに亜鉛がドーパミンの摂食抑制効果を阻害したのではないかと、また摂食情報をもとに AMPK による摂食調節が行われたのではないかなどと考えられた。今回の研究では大まかな代謝物の変化を捉えたので、今後はこれらを基に詳細な関連性を研究していく予定である。

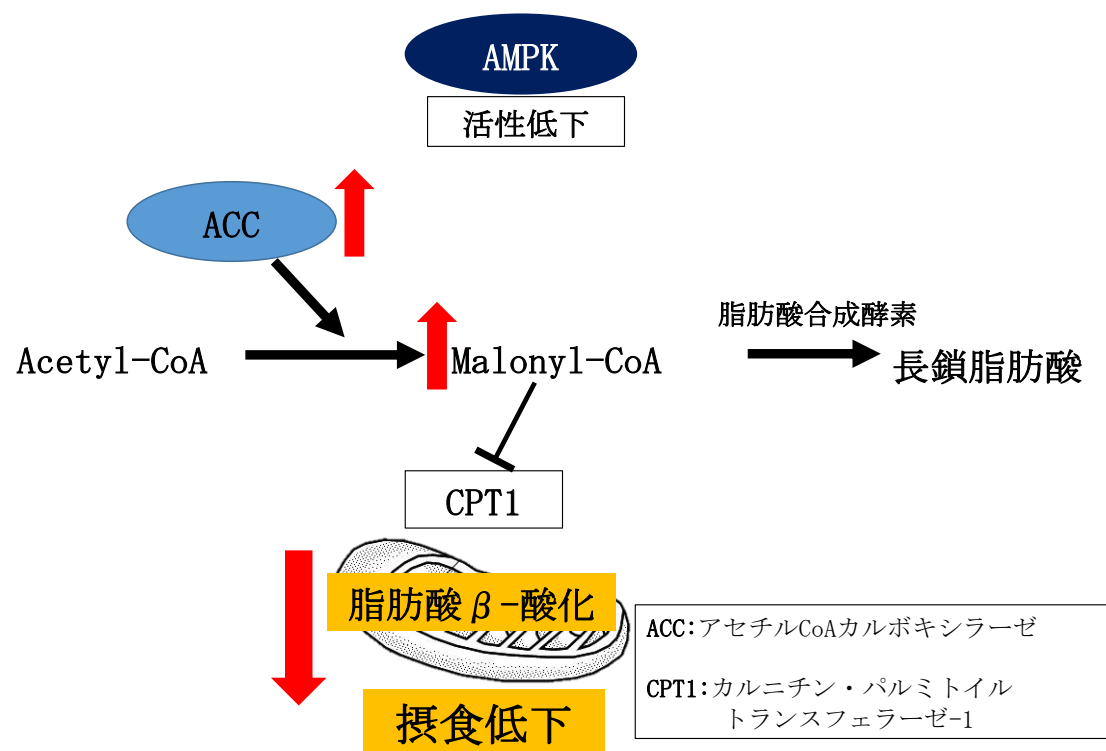


Fig. 3-8 AMPKによる食欲調節機構

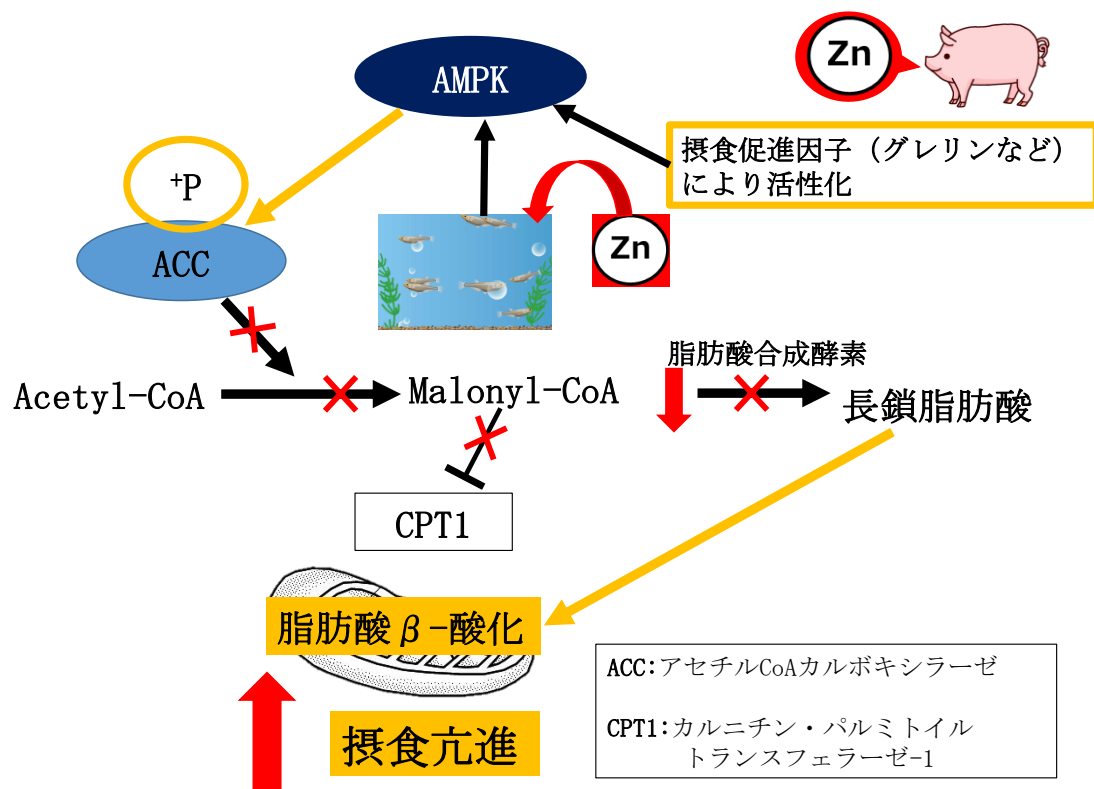


Fig. 3-9 AMPKによる食欲調節機構



### 3. 5 結論

これらの解析結果から、消化管経路の亜鉛投与が視床下部における摂食調節系のシグナルに大きく影響を与えていることが初めて示され、亜鉛の摂食亢進作用のメカニズムの一端が解明された。脳内ではこれらの情報と他器官からの情報が統合され、摂食コントロールがなされているため、今後さらなる検討が必要と考えている。

## 総合考察

本研究では、食欲亢進作用を介した亜鉛の機能性を明らかにすることを目的として、ヒト試験で周術期の血清亜鉛値と亜鉛入り栄養補助食品の有用性に関する検討、亜鉛付加による他の2価陽イオンの吸収への影響及び、周術期の血清亜鉛値と摂食量に関する検討を行った。さらに、動物実験により亜鉛経口投与によるラットの摂食亢進効果に関する脳視床下部メタボローム解析を行った。これらの研究により、以下の知見を明らかにした。

1. 周術期食欲不振症例への亜鉛付加は、食欲を回復させる可能性が示され、血清亜鉛値の低下を防ぎ、在院期間の短縮にも期待がもてるものと考えられた。
2. 亜鉛経口付加により、血清二価陽イオン類の濃度の平均値を見ると、亜鉛、銅、濃度は術後の経過とともにむしろ上昇し、カルシウム濃度は横ばいであった。これらの変化には有意な差が認められず、鉄濃度の変化もほとんど見られなかったため、いずれの二価陽イオンとも、亜鉛付加によって吸収が妨げられていないものと推察された。VASを用いて聞き取った「食欲の程度」も経過と共に亢進した。従って、食欲不振時の亜鉛付加による血清亜鉛値の上昇は、食欲の亢進と術後の回復に関与している可能性が示唆された。また亜鉛付加群は、付加無群に比べ術後7日目でも有意に摂取カロリーが多かった。1日でも早く栄養状態を良くしてリハビリを行わなければならない患者のためには、早期の亜鉛付加は有用であると考えられた。
3. ラットへの亜鉛経口投与では、視床下部の3-aminopropanoic acid ( $\beta$ -アラニン)、ヒポタウリン、ドーパミンとビオチンの濃度が有意に増加しており、消化管経路の亜鉛投与が視床下部における摂食調節系のシグナルに大きく影響を与えていることが初めて示された。

本研究より、亜鉛の経口投与は食欲を回復させて摂取カロリーを増加させ、病態を改善させることが示唆された。また、ラット脳・視床下部のメタボローム解析結果から、亜鉛経口投与による食欲亢進作用のメカニズムを推定することができた。

## 参考文献

- 1) 大類孝:超高齢社会における誤嚥性肺炎の現状. 日老医誌 50(4):458-460, 2013
- 2) 倉澤隆平, 久堀周治郎, 奥泉宏康:亜鉛基礎研究の最前線と亜鉛欠乏症の臨床. Biomed Res Trace Elements 21(1):1-12, 2010
- 3) Ohinata K, Takemoto M, Kawanago M, et al:Orally administered zinc increases food intake via vagal stimulation in rats. J.Nutr.139:611-616. 2009
- 4) 宮田学, 奥野資夫, 島村佳成ほか:老年者における亜鉛の吸収と排泄. 日老医誌 24(3):272-277, 1987
- 5) 尾島敏彦, 西村元一, 伏田幸夫ほか:手術侵襲による血清亜鉛の変動. 日消外会誌 40(7):1354, 2007
- 6) 日前敏子, 野坂仁愛, 河野菊弘ほか:高齢者における手術前後の血清亜鉛、銅濃度の検討. 日消外会誌 18(6):1236. 1985
- 7) 梅津理一郎, 井上善文, 松尾吉康ほか:消化器手術後の血漿亜鉛値の変動について. 日消外会誌 18(6):1236. 1985
- 8) 西内美香, 大谷昌道, 岩渕恵江ほか:術後患者への早期介入と栄養補助食品 周術期の血清亜鉛濃度と栄養補助食品の有用性について. ヒューマンニュートリション 日本医療企画, 東京, No. 31:68-71. 2014
- 9) 倉澤隆平, 久堀周治郎:亜鉛欠乏症について, 亜鉛欠乏症の臨床および住民の微量元素亜鉛の不足傾向について. 亜鉛欠乏に関する研究会報告書. 長野県国民健康保険団体連合会および長野県国保直診医師会 , 2006
- 10) 倉澤隆平, 久堀周治郎, 上岡洋晴ほか:長野県北御牧村村民の血清亜鉛濃度の実態. Biomed Res Trace Elem, 16(1):61-65, 2005
- 11) 志村充広, 土屋誉:消化器外科手術における血清亜鉛値の変動. 外科と代謝・栄養 49(1):43-53, 2015
- 12) 厚生労働省健康局:日本人の食事摂取基準(2010年版), 2009
- 13) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室:平成 24 年国民栄養調査・栄養調査結果の概要. 2013

- 14) Gallaher D.D., Johnson P.E., Hunt J.R. et al.: Bioavailability in humans of zinc from beef: intrinsic vs extrinsic labels. *Am J Clin Nutr* 48:350-354, 1988
- 15) 駒井三千夫, 神戸大朋: 亜鉛の機能と健康—新たにわかった多彩な機能—, 建帛社, 東京, 2013, p2, 28, 32, 54, 63
- 16) 倉澤隆平, 久堀周治郎: 臨床現場での微量元素摂取状況と摂取基準のギャップ. *Biomed Res Trace Elements* 19(1):4-6, 2008
- 17) Komai M, Goto T, Suzuki H, et al.: Zinc deficiency and taste dysfunction: contribution of carbonic anhydrase, a zinc-metalloenzyme, to normal taste sensation. *BioFactors* 12(1-4):65-70, 2000
- 18) Goto T, Komai M, Bryant BP, et al.: Reduction in carbonic anhydrase activity in the tongue epithelium and submandibular gland in zinc-deficient rats. *Int J Vitamin Nutr Res* 70(3):110-118, 2000
- 19) 西田圭吾: こここまで分かった亜鉛の免疫システムにおける役割. *日衛誌* 68, 145-152, 2013
- 20) 山崎英文, 北村慎一, 長尾正一ほか: 血清亜鉛の急性心筋梗塞における推移と臨床的意義. *心臓* 19(6), 699-704, 1987
- 21) 石黒源之, 安江隆夫, 渡辺佐知郎ほか: 急性心筋梗塞時の血清亜鉛の動向 (第2報): 変動酵素との関係について. *日本循環器学会誌* 46, Suppl. III, 596, 1982
- 22) Low W.I., Ikram H.: Plasma zinc concentration in acute myocardial infarction. Diagnostic and prognostic implications. *Br Heart J* 38, 1339, 1976
- 23) Yanagisawa H. and Nodera M.: Zinc physiology and clinical practice. *Biomed Res Trace Elem.* 18(1), 3-9, 2007
- 24) Soinio M., Mamlemi J., Laakso M. et al.: Serum zinc level and coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 30(3), 523-528, 2007

- 25) 西内美香, 大谷昌道, 紺野亜衣ほか:開心術または冠動脈バイパス移植術を受けた患者における血清亜鉛値の変化と亜鉛付加の有用性について. 日本静脈経腸学会雑誌 31(5), 1136-1140, 2016
- 26) 清水教一:Wilson 病に対する亜鉛治療の実際. 亜鉛栄養治療 2(1), 30-34, 2011
- 27) 関根孝司:鉄の膜輸送の分子機構. 日本薬理学雑誌 116(6), 398  
<http://www.pharmacol.or.jp/fpj/topic/topic116s.htm>
- 28) 篠原厚子, 千葉百子:微量元素の健康への影響. 応用物理 70(7), 823-826, 2001
- 29) 佐藤幸人:外来. 心臓 48(7), 718-724, 2016
- 30) Suzuki H, Asakawa A, Li JB, et al:Zinc as an appetite stimulator - the possible role of zinc in the progression of diseases such as cachexia and sarcopenia. Recent Pat Food Nutr Agric. 3:226-231, 2011
- 31) Tamaki Nanaya, Fijimoto-Sakata Shigeko, Kikugawa Mariko, et al:Analysis of cyclic feed intake in rats fed on a zinc-deficient diet and the level of dihydropyrimidinase(EC3.5.2.2). British journal of Nutrition. 73:711-722, 1995
- 32) 駒井三千夫, 後藤知子, 大日向耕作ほか:消化管亜鉛シグナルによる食欲亢進作用のメカニズム. Yakugaku Zasshi138(8):1011-1016, 2018
- 33) Selvais PL, Labuche C, Nguyen XN, et al:Cyclic feeding behaviour and changes in hypothalamic Galanin and neuropeptide Y gene expression induced by zinc deficiency in the rat. J Neuroendocrinol 9:55-62, 1997
- 34) Glowinski J, Iversen LL.:Regional Studies Of Catecholamines In The Rat Brain-1. 13:656-657, 1966
- 35) Paxinos G, and Watson C. The Rat Brain IN STEREOTAXIC COORDINATES. Academic Press. USA 1998
- 36) Bligh EG, Dyer WJ:A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37:911-917, 1959
- 37) Nishiumi S, Kobayashi T, Kawana S, et al.:Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. Oncotarget 2:1-12, 2017

- 38) Wiklund S, Johansson E, Sjostrom L, et al: Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Anal Chem.* 80:115-122, 2008
- 39) Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, et al: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-95, 2006
- 40) Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, et al: Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671, 2000
- 41) Oomura Y, Ono T, Ooyama H, et al: Glucose and Osmosensitive Neurones of the Rat Hypothalamus. *Nature* 222:282-284, 1969
- 42) Baltaci AK, Mogulkoc R: Leptin and zinc relation: In regulation of food intake and immunity. *Indian J Endocrinol Metab* 16(Suppl 3):S611-S616, 2012
- 43) Schetz JA, Sibley DR: Zinc allosterically modulates antagonist binding to cloned D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurochem.* 68(5):1990-1997, 1997.
- 44) Li Y, Mayer FP, Hasenhuettl PS, Burtcher V, et al.: Occupancy of the zinc-binding site by transition metals decreases the substrate affinity of the human dopamine transporter by an allosteric mechanism. *J. Biol. Chem.* 292(10):4235-4243, 2017
- 45) Li Y, Hasenhuettl PS, Schicker K, et al: Dual action of Zn<sup>2+</sup> on the transport cycle of the dopamine transporter. *J. Biol. Chem.* 290:31069-31076, 2015
- 46) Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I: Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nature Review* 10:780-791, 2009
- 47) Hashimoto A, Kambe T, Komai M, et al: Properties of Zip4 accumulation during zinc deficiency and its usefulness to evaluate zinc status: a study of the effects of zinc deficiency during lactation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 310:R459-R468, 2016
- 48) 箕越靖彦: 視床下部 AMPK キナーゼによる摂食調節機構. *日薬理誌* 137:172-176, 2011
- 49) Gao S, Kinzig KP, Aja S, et al: Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:17358-17363, 2007

- 50) Lopez M, Lage R, Saha Asish K, et al: Hypothalamic Fatty Acid Metabolism Mediates the Orexigenic Action of Ghrelin. *Cell Metabolism* 7:389-399, 2008
- 51) Sone H, Kamiyama S, Higuchi M, et al: Biotin augments acetyl CoA carboxylase 2 gene expression in the hypothalamus, leading to the suppression of food intake in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 476:134-139, 2016
- 52) Wei J, Zhang Y, Yu TY, et al: A unified molecular mechanism for the regulation of acetyl-CoA carboxylase by phosphorylation. *Cell Discov* 2 16044:1-12, 2016
- 53) Wu K, Huang C, Shi X, et al: Role and mechanism of the AMPK pathway in waterborne Zn exposure influencing the hepatic energy metabolism of *Synechogobius hasta*. *Sci Rep.* 6 38716:1-13, 2016
- 54) Inui A, Asakawa A, Bowers CY: Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J.* 3:439-456, 2004
- 55) Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, et al: UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature.* 454:846-851, 2008
- 56) Yin J, Li X, Li D, et al: Dietary supplementation with zinc oxide stimulates ghrelin secretion from the stomach of young pigs. *J Nutri Biochem.* 20:783-790, 2009
- 57) 平松毅幸：外科手術後の蛋白代謝、免疫能、内分泌反応におよぼす栄養投与経路の影響—胃切除ラットにおける経腸栄養法と経静脈栄養法の比較検討。日消外会誌 23(6):1207-1219, 1990
- 58) Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, et al: Zinc homeostasis and signaling in health and diseases Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem.* 16:1123-1134, 2011
- 59) 橋本彩子, 辻徳治, 神戸大朋ほか：消化管における必須微量金属の吸収—トランスポーターによる制御機構—。Trace Nutrients Research 28:89-94, 2011

## 謝辞

本研究を行うにあたり、本学 栄養学分野の駒井三千夫教授に心から感謝の意を表します。大変御多忙の中、実験及び論文指導だけではなく転職の機会をも与えていただき公私共々有難うございました。

研究者として未熟な私に、やさしく指導していただいた白川仁准教授に深く感謝いたします。また行き詰った際によく相談にのっていただき、その都度丁寧に御指導いただき大変有難うございました。

本論文の副査にあたり多くの御指導をいただきました食品化学分野の戸田雅子教授、大学院前期課程でも御指導いただいた機能分子解析分野の仲川清隆教授に御礼申し上げます。

また、大分大学医学部全学研究推進機構 実験実習機器部門 酒井久美子助教には実験の進め方を手取り足取り教えていただき、さらにメタボローム解析を行って戴き、その後も統計処理などご教授賜り、心から御礼申し上げます。

本分野の事務補佐の村上素子氏に感謝いたします。村上さんの細やかな心配りに何度救われたかわかりません。有難うございました。

また私がこの研究室生活を送ることができたのは、ラット実験で様々な御指導をいただきました大井みなみ氏、中居久拓氏、袖山尚紘氏、メタボローム解析で御指導いただきました長谷川雄大氏をはじめ研究室の皆さまのおかげです。心より感謝いたします。さらに実験棟の有野祐樹氏には、時間的な配慮（当方が社会人学生であるため物が届く時に必ずしも大学内にいれず）、さらには動物実験についてのマニュアルテキストの教授、急な備品の手配など柔軟に対応して戴き感謝申し上げます。それがなければ動物実験を遂行することはできなかつたと感じております。この他、新キャンパスに来てからは、大学院前期課程で御教授いただいた加藤俊治氏、宮澤大樹氏には実験で困った時に助けて戴き、また同級生の伊藤隼哉氏、乙木百合香氏には励まされ、お陰様で研究を最後まで継続することができました。心より感謝申し上げます。

職場では、尚絅学院大学健康栄養学科学科長布木和夫教授、臨床栄養を一緒に担当している片山一男教授、赤坂和昭教授、星清子教授、木村ふみ子准教授には、仕事面で配慮して頂いた他、論文作成にあたり御教授頂きまして御礼申し上げます。心が折れそうな時には励ましのお言葉を頂戴し、お陰様でここまで到達できました。感謝申し上げます。

最後に、私の健康面、精神面を支え続けてくれた両親、本研究に携わった全ての皆様に本論文の完成をもって感謝の気持ちに代えさせていただきます。

平成 30 年 12 月

西内 美香